

UNIVERSITÉ DE NANCY - FACULTÉ DE PHARMACIE

1932-1933

N°

Étude Morphologique et Biologique
de *B. caryocyaneus* Beijerinck-Dupaix 1930

Recherches sur le mécanisme du phénomène
de Charrin et Roger (Agglutination sérique des Bactéries)

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le Mars 1933

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

pour obtenir le Titre

de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

(Mention Pharmacie)

PAR

ANDRÉE DUPAIX

Pharmacien

Diplômée de Microbiologie

née le 17 Juin 1906 à Marbache (Meurthe-et-Moselle)

Examineurs . .	{	MM. LASSEUR	{	Président.
		THIRY		Juges.
		VERNIER		

1933

SOCIÉTÉ D'IMPRESSIONS TYPOGRAPHIQUES

NANCY

UNIVERSITÉ DE NANCY - FACULTÉ DE PHARMACIE

1932-1933

N^o.

Étude Morphologique et Biologique
de *B. caryocyaneus* Beijerinck-Dupaix 1930

Recherches sur le mécanisme du phénomène
de Charrin et Roger (Agglutination sérique des Bactéries)

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le Mars 1933

A LA FACULTE DE PHARMACIE DE NANCY

pour obtenir le Titre

de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY
(Mention Pharmacie)

PAR

ANDRÉE DUPAIX

Pharmacien

Diplômée de Microbiologie

née le 17 Juin 1906 à Marbach (Meurthe-et-Moselle)

Examineurs . . { MM. LASSEUR Président.
 { THIRY }
 { VERNIER } Juges.

NANCY

SOCIÉTÉ D'IMPRESSIONS TYPOGRAPHIQUES

1933

Université de Nancy — Faculté de Nancy

PERSONNEL ENSEIGNANT

DOYEN HONORAIRE:

M. BRUNTZ, O. ✱, ☼, I ☼, O. ☼, ✕, ✕, Recteur de l'Académie de Nancy

PROFESSEURS HONORAIRES:

MM. FAVREL, ✱, I ☼

BRUNTZ, O. ✱, ☼, I ☼, O. ☼, ✕, ✕

DOYEN:

M. SEYOT, ✱, ☼, I ☼, ☼

ASSESEUR:

M. LASSEUR, I ☼, ☼

PROFESSEURS:

MM. GRÉLOT, ✱, I ☼, ☼.....	Pharmacie galénique.
DOURIS, I ☼, ☼, ✕.....	Toxicologie.
PASTUREAU, O ✱, I ☼.....	Pharmacie chimique.
SEYOT, ✱, ☼, I ☼, ☼.....	Histoire naturelle.
LASSEUR, I ☼, ☼.....	Microbiologie.
GILLOT, I ☼, ☼.....	Matière médicale.
PREVOST ☼, chargé de cours magistral.....	Chimie organique.

AGRÉGÉ LIBRE:

M. GIRARDET, ✱, I. ☼..... Chimie et Toxicologie.

CHARGÉS DE COURS

MM. GRÉLOT, ✱, I ☼, ☼.....	Hydrologie.
PASTUREAU O ✱, I ☼.....	Chimie biologique.
SEYOT ✱, ☼, I ☼, ☼.....	Hygiène.
VERNIER, I ☼.....	Zoologie,
GILLOT, I ☼, ☼.....	Pharmacotechnie.
CORDEBARD, I ☼, ☼.....	Analyse chimique.
RENARD, I ☼.....	Législation et Déontologie.
PREVOST ☼.....	Chimie minérale et Minéralogie
DONZELOT.....	Physique.

CHEFS DE TRAVAUX:

MM. VERNIER, I ☼.....	Microbiologie et Parasitologie.
CORDEBARD, I ☼, ☼.....	Chimie et Analyse chimique.
STEIMETZ.....	Micrographie.
MEUNIER.....	Pharmacie.
DONZELOT, (chargé de travaux).	Physique.
MICHON (chargé de travaux)..	Chimie biologique et Toxicologie.

SECRÉTARIAT:

M. E. TRIBOLET, I ☼..... Secrétaire.

La Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend ni les approuver ni les imputer.



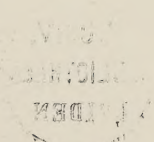
A Monsieur le Professeur H. VINCENT

Membre de l'Institut.

Membre de l'Académie de Médecine.

Professeur au Collège de France.

Hommage de respectueuse reconnaissance





Digitized by the Internet Archive
in 2026

AVANT-PROPOS

Cataloguer et classer des résultats est chose aisée, les interpréter est déjà plus difficile, mais « savoir lire... et rapporter ce qu'on a lu, et ni plus ni moins que ce qu'on a lu » est une tâche singulièrement ardue pour le jeune chercheur qui ne peut appliquer le « principe de la table rase » sans supprimer du même coup la somme des connaissances péniblement acquises.

Comme le navigateur salue avec joie les balises qui lui indiquent les endroits périlleux, le jeune travailleur garde une reconnaissance émue à celui qui lui signale les écueils à éviter.

Je ne puis donc commencer cet avant-propos sans prononcer avec gratitude le nom de M. le Professeur VINCENT, Membre de l'Institut, Membre de l'Académie de Médecine, qui a bien voulu s'astreindre à la lecture de ce manuscrit. Je remercie l'illustre savant de cette haute marque de bienveillance et de l'intérêt qu'il a témoigné à mes modestes recherches.

Le chapitre relatif à la classification a été rédigé sous les hautes directives de M. le Professeur CUÉNOT, Membre de l'Institut. Je prie le célèbre biologiste de bien vouloir agréer mes très respectueux remerciements.

Dès qu'il veut élargir le cadre de ses recherches, le débutant se heurte à des difficultés techniques considérables. Et si je n'ai pas été arrêtée par de tels obstacles, c'est parce que MM. les Professeurs KLUYVER, BOUTARIC, LECOMTE DU NOUY, METALNIKOV, MAGROU, NEGRE, HAUDUROY m'ont, à des titres différents, facilité l'élaboration de ce travail.

Je remercie M. le Doyen SEYOT de toutes les marques de bienveillance qu'il a pu me donner durant mon séjour à la Faculté de Pharmacie.

Je remercie M. le Professeur THIRY de l'honneur qu'il a bien voulu me faire en acceptant de juger ce travail. Je suis d'autant plus reconnaissante à l'éminent Professeur que son nom est intimement lié à l'histoire des Bactéries chromogènes.

Le premier arrivé au Laboratoire, le dernier parti de la salle de travail, toujours courbé sur un microscope ou un instrument de mesure qu'il ne quitte que pour établir ou contrôler les détails d'une autre expérience, M. le Professeur LASSEUR ne s'est pas limité au choix du sujet à étudier, il a

vérifié toutes mes mesures, contrôlé mes observations macroscopiques et microscopiques, et discuté toutes les interprétations de résultats. C'est dans ces discussions du plus haut intérêt que j'ai puisé les idées générales qui constituent le fond de ce travail. Je prie M. le Professeur LASSEUR de bien vouloir agréer mes faibles remerciements et l'assurance de ma gratitude infinie.

Je n'ai jamais fait en vain appel à l'inépuisable obligeance de M. le Professeur VERNIER, je le remercie bien sincèrement de m'avoir prodigué ses conseils et d'avoir bien voulu me faire bénéficier de son talent de dessinateur.

Il ne suffisait pas d'avoir obtenu des variations d'une espèce bactérienne, il fallait encore isoler une seule plastide, ce qui a été réalisé grâce à l'amabilité de mon dévoué camarade, M. MARCHAL; je l'en remercie.

A tous mes camarades du Laboratoire et en particulier à MM. HÆUSSLER, OLIVIER, FRIBOURG, DOMBRAY, SERRA, R. MARTIN, GROJEAN, Mme et M. MOREL, Mlles ZAHL, GEORGES, RENAUX, LÉCAILLE, je dis un profond merci.

Je n'aurais garde d'oublier les services rendus par MM. JACQUOT et SACCHETTI, au cours de ces longues années de recherche.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

PREMIÈRE PARTIE

Etude morphologique et biologique de *B. caryocyaneus*

BEIJERINCK-DUPAIX 1930

	Pages
CHAPITRE I. — Origine; Habitat; Isolement	13
Morphologie	14
Généralités.....	14
Formes, succession des formes.....	16
Conditions d'observation	17
Mode de groupement des plastides, Colonies élémentaires.	17
Forme dans les milieux usuels et dans les milieux syn- thétiques.....	18
Forme dans les conditions défavorables de culture :	
Milieu phéniqué.....	19
Milieu lithiné.....	19
Culture à 40° C.....	22
Formes de résistance. Spores.....	23
Structure de la plastide.....	24
1) Généralités sur la structure des plastides bactériennes	24
2) Structure des plastides de <i>B. caryocyaneus</i>	36
a) Membrane.....	36
b) Capsule.....	37
c) Cytoplasme. Vacuoles.....	42
Granulations. Grains.....	46
Mouvement. Organes du mouvement.....	46
Dimensions.....	52
Coloration par la méthode de GRAM.....	58
CHAPITRE II. — Caractères de culture	65
Caractères généraux de culture.....	65
Action de la chaleur.....	65
Influence de l'oxygène.....	77
Odeur des cultures.....	79

	Pages
Caractères de culture sur milieux non chimiquement définis.....	80
A) Milieux usuels.....	80
Liquéfaction de la gélatine par <i>B. caryocyanus</i>	83
B) Milieux spéciaux :.....	89
Recherche de la diastase protéolytique.....	91
Recherche de l'indol.....	92
Fermentation des sucres.....	95
Pouvoir réducteur.....	97
Culture de <i>B. caryocyanus</i> sur milieux chimiquement définis.....	99
Aliment minéral.....	103
Influence du phosphore.....	103
Influence du magnésium.....	104
Influence du fer.....	112
Aliment hydrocarboné.....	116
Relation entre le <i>pH</i> du milieu et le pouvoir chromogène de <i>B. caryocyanus</i>	119
CHAPITRE III. — Étude de la caryocyanine.....	125
Corps colorés fabriqués par <i>B. caryocyanus</i>	125
Siège de la matière colorée.....	126
La caryocyanine est-elle un colorant au sens de WITT ?..	129
Extraction de la caryocyanine.....	129
Propriétés des cultures colorées.....	130
Différenciation de la caryocyanine et de quelques pigments	135
Rôle des pigments bactériens.....	138
CHAPITRE IV. — Action de différentes substances chimiques sur la vie de <i>B. caryocyanus</i> . Généralités.....	143
Action bactéricide de l'acide phénique.....	147
Cultures de <i>B. caryocyanus</i> en présence de matières colorantes.....	156
Action du sulfocyanure de potassium sur les suspensions de <i>B. caryocyanus</i>	162
Pouvoir bactéricide de l'argent métallique.....	163
CHAPITRE V. — Action de <i>B. caryocyanus</i> sur différents organismes vivants.....	171
Pouvoir pathogène.....	171
Inoculation à quelques Mammifères.....	171
Inoculation à la Grenouille.....	173
Inoculation aux larves de <i>Galleria mellonella</i>	174
Inoculation à certains végétaux.....	176
Réactions anticorps.....	178
Agglutination.....	183
Aspect de l'agglutination.....	183
Modifications de l'agglutinabilité.....	187
Influence du chauffage à 80° C.....	188

	PAGES
Influence de la concentration des systèmes agglutinants en corps microbiens	189
Influence de la réaction du milieu de culture utilisé pour la production des corps bactériens.....	190
Culture en milieu phéniqué.....	191
Culture en milieu lithiné.....	193
Variation du pouvoir agglutinogène et de l'agglutinabilité des différentes races et souches de <i>B. caryocyaneus</i>	198
Agglutination hétérologue. Coagglutination.....	209
Réaction de CASTELLANI.....	203
Agglutinines multiples.....	206
Recherches des agglutinines chez les végétaux soumis à des injections de <i>B. caryocyaneus</i>	209
Sensibilisation. Fixation de l'alexine.....	214
CHAPITRE VI. — Variation.....	219
Arguments qui militent en faveur de l'étude de la variabilité chez les Bactéries.....	222
Complications dans l'étude de la variabilité chez les Bactéries.....	223
Obtention de cultures à partir d'une seule plastide bactérienne.....	226
Modifications antérieurement décrites chez les Bactéries fluorescentes.....	228
Modification présentée par <i>B. caryocyaneus</i> , race fluorescente verte.....	229
Race achromogène de <i>B. caryocyaneus</i>	237
CHAPITRE VII. — Nomenclature. Place de <i>B. caryocyaneus</i> dans la classification.....	243
Recherche des affinités de <i>B. caryocyaneus</i> avec les espèces voisines.....	252

DEUXIEME PARTIE

Recherches sur le mécanisme du phénomène de CHARRIN et ROGER (Agglutination sérique des Bactéries)

CHAPITRE I. — Découverte de l'agglutination. Généralités sur le phénomène de CHARRIN et ROGER.....	257
Facteurs de stabilité et d'instabilité des suspensions bactériennes.....	259
Mouvement brownien, mouvement vital.....	259

	Pages
Charge électrique.....	260
Force de cohésion, force capillaire, tension superficielle, sphère d'attraction, choc, viscosité	260
Protection.....	261
<i>pH</i> ; mouillabilité.....	261
Dimensions des particules dispersées.....	261
Notion de potentiel critique.....	261
Fixation de l'anticorps.....	263
 CHAPITRE II. — Recherches personnelles sur le mécanisme du phénomène	
de CHARRIN et ROGER.....	265
Transport électrique.....	265
<i>pH</i> et agglutination.....	266
1) Action du <i>pH</i> sur la marche générale de l'agglutina- tion.....	267
2) Action du <i>pH</i> sur le volume des plastides bactériennes.	273
Variation de volume des plastides non additionnées de sérum.....	275
Variation de volume des plastides additionnées de sérum d'animaux non préparés.....	276
Variation de volume des plastides additionnés de sérum agglutinant (complexe anticorps-antigène).....	276
Influence de la composition de la solution tampon.....	280
Facteurs de stabilité des suspensions microbiennes chauf- fées à 80° C.....	285
 CHAPITRE III. — Variation de quelques paramètres au cours de l'aggluti- nation sérique des Bactéries	
Variation de la tension superficielle, de la charge électri- que, de la viscosité, de la conductibilité et du <i>pH</i> au cours de l'agglutination sérique.....	295
Abaissement expérimental de la tension superficielle et stabilisation des systèmes agglutinants par addition de substances tensio-actives.....	308
Variation de la tension superficielle, de la différence de potentiel, du <i>pH</i> et de la conductibilité par addition de substances tensio-actives aux systèmes aggluti- nants.....	315
Interprétation.....	319
Quelques conclusions.....	326
CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....	327
Bibliographie. Littérature générale.....	335
	348



INTRODUCTION

Lorsqu'on isole une Bactérie, on éprouve souvent de grandes difficultés à l'identifier avec telle ou telle forme antérieurement décrite et parfois même l'identification est impossible (1). Cela tient à des causes diverses. Certains pensent que le désir, conscient ou non, de découvrir une espèce nouvelle pousse quelquefois les auteurs à limiter leurs investigations, qui, approfondies, auraient permis de situer le germe étudié dans le cadre de formes déjà décrites (2). Nous ne croyons pas que ce facteur psychique ait eu une grande influence sur la brièveté de certaines monographies. D'ailleurs, des descriptions assez développées peuvent constituer des documents biologiques fort intéressants sans fournir pour cela tous les points de repère (3) qu'exige une diagnose un peu précise.

Suivant ses goûts et ses aptitudes, l'auteur concentre ses efforts sur le point qui l'intéresse, et c'est là un sentiment profondément humain.

En présence des difficultés que présentait la diagnose des espèces bactériennes, le Comité des bactériologistes américains (1897-1898) d'une part, GRIMBERT (1903) et THIRY (1903), d'autre part, ont conseillé d'unifier, de standardiser les méthodes employées en Microbiologie. Avec juste raison, GRIMBERT a attiré l'attention des microbiologistes sur le rôle important que pouvaient jouer les « *fonctions biochimiques* » dans la diagnose des Bactéries. Le Comité américain a proposé un plan d'études qui comporte deux séries d'épreuves à faire subir aux Bactéries que l'on étudie. Les épreuves de la première série sont obligatoires, celles de la seconde sont facultatives. Cette division n'est nullement justifiée, ainsi que le fait judicieusement remarquer GRIMBERT (1903).

(1) Ce qui expliquerait une multiplication d'espèces pas toujours très justifiée.

(2) Ce reproche ne saurait être fait aux bactériologistes de la première heure qui, en l'absence de moyens d'investigation plus perfectionnés, ont dû limiter leurs descriptions à l'échelle de leur observation.

(3) Les microbiologistes oublient souvent que la grande découverte de B. et A. DE JUSSIEU, qui les place à certains points de vue au-dessus de LINNÉ lui-même, est celle de la subordination des caractères. « *Les caractères doivent être pesés et non comptés* ». On se heurte immédiatement à une première difficulté, celle de la propriété définissante. Or, pour reconnaître si une propriété ou un caractère est définissant, la pierre de touche est de savoir si cette propriété ou ce caractère est singulier ou commun à plusieurs Bactéries.

Pour la rédaction de son « essai-programme », G. THIRY (1903) s'est évidemment inspiré du plan préconisé par le Comité américain, mais le savant nancéen envisageait la question sous un angle différent. L'« essai-programme » n'a pas été dressé uniquement en vue de la diagnose de l'espèce, il devait aussi servir de directive aux jeunes travailleurs qui abordaient les recherches microbiologiques.

De tels programmes ont élargi le champ d'activité des bactériologistes, mais il ne suffit pas d'éveiller des idées, il faut aussi créer des techniques qui permettent de vérifier les hypothèses émises. Une complication surgit immédiatement : la solution de chaque problème n'est possible que par une méthode adaptée à la nature de ses données et de ses difficultés. Par suite, le microbiologiste qui voudrait effectuer une étude approfondie de chacun des points de ces « plans-programmes » serait obligé de se familiariser avec de nombreuses techniques. Mais nous avons passé l'âge des expériences faciles, l'expérimentation devient de plus en plus compliquée et l'étude d'une technique remplit quelquefois la vie d'un chercheur. Mes investigations n'ont donc porté que sur quelques parties des programmes préconisés. D'ailleurs, si un débutant peut utilement s'inspirer des idées directrices des « plans-programmes », il serait imprudent de suivre servilement une standardisation qui rappelle la réglementation d'Auguste COMTE (1) et enlève toute initiative au travailleur.

Sous ces réserves, il faut reconnaître que ces plans d'étude ont rendu des services lorsque l'expérimentation microbiologique était purement qualitative. Pour la majorité des savants de cette époque, les sciences biologiques devaient se contenter de décrire les phénomènes et elles ne pouvaient pas atteindre le stade quantitatif. Or, on ne peut pas nous demander d'accumuler des faits comme un manœuvre amasse des matériaux de construction, sans nous permettre de concrétiser notre pensée sous la forme d'une généralisation plus ou moins approchée. Comme tous les expérimentateurs, nous trouvons commode de substituer à la réalité complexe des formules simples qui nous servent de fils conducteurs, stimulent notre zèle au travail et nous donnent au moins l'illusion de tout expliquer.

C'est la raison pour laquelle LASSEUR (1921-1923), LASSEUR, HOEUSLER et DUPAIX (1930) ont attiré l'attention des microbiologistes sur l'in-

(1) La standardisation outrancière fait penser aux Corps constitués d'Aug. COMTE composés d'hommes jugés compétents et armés de toutes les rigueurs du bras séculier. Nous ne pensons pas que la recherche désintéressée puisse s'accommoder actuellement d'une telle conception des choses.

térêt qu'il y aurait à substituer la notion quantitative à la notion qualitative.

D'ailleurs CAMPBELL et Lord KELVIN ont insisté sur l'importance de la notion quantitative. THOMSON s'écrie notamment : « *Quand vous pouvez mesurer ce dont vous parlez et l'exprimer en nombre, vous en connaissez quelque chose ; au contraire, quand vous ne pouvez pas le mesurer ni l'exprimer en nombre, votre connaissance est précaire et peu satisfaisante* ».

C'est pourquoi dans l'étude de *B. caryocyaneus*, je me suis attachée à substituer, autant que possible, la notion quantitative à la notion qualitative.

Etant donnée la complexité du fait biologique, on pourrait être tenté de multiplier considérablement les expériences afin d'augmenter la précision de la détermination d'une grandeur donnée. Or, il ne faut pas oublier, ainsi que le fait justement remarquer CAMPBELL, que la « *précision n'augmente pas indéfiniment ni même d'une façon continue avec le nombre d'observations* ». S'il est indispensable en microbiologie de répéter les expériences un assez grand nombre de fois, il faut aussi s'efforcer de réaliser « *la bonne expérience* ».

Les Bactéries sont des êtres vivants, et de ce fait, leur étude, tout en utilisant une technique spéciale, ne peut pas s'appuyer sur des principes fondamentalement différents de ceux employés dans l'étude des animaux et des végétaux.

La Botanique n'a pas exclusivement pour but l'énumération des formes des plantes, et les morphologistes ne doivent pas être considérés comme de purs dessinateurs, car on sait combien l'étude des lois morphogéniques a été féconde. Par suite, l'étude d'une Bactérie comprendra tout d'abord celle de sa morphologie et notamment de ses dimensions. A ce propos, nous rappellerons les difficultés qui s'observent dans la fluctuation en Physique et la fluctuation en Biologie. On connaît les difficultés auxquelles se sont heurtés les physiciens lorsqu'ils ont voulu dégager le phénomène des fluctuations de lois que l'on croyait infiniment précises.

Ces difficultés tiennent avant tout au nombre prodigieux des éléments (atomes, molécules, etc....) qui interviennent dans les phénomènes physiques. « *La loi des grands nombres s'y trouve généralement satisfaite avec une précision qui dépasse de beaucoup la finesse de nos procédés expérimentaux d'investigation* » (GUYE, 1922, p. 62).

En Microbiologie, les choses se passent de toute autre façon. Le nombre des éléments qui interviennent dans une statistique est infiniment plus petit et « *l'amplitude des fluctuations est telle, qu'elle masque le plus sou-*

vent au premier abord la tendance générale: la loi statistique. » (GUYE, 1922, p. 62). A cette première complication du petit nombre d'éléments s'en ajoute une seconde tout aussi importante : l'hétérogénéité du matériel bactérien. On obtient des résultats d'une moindre complication en opérant sur des populations issues d'une seule plastide. Dans ces conditions, le nombre d'éléments qui interviennent dans la statistique est plus grand, l'amplitude des fluctuations est plus faible, et le plus souvent elle ne masque pas la tendance générale, c'est-à-dire la loi statistique. Ce point est capital pour la recherche microbiologique moderne. Il ne suffit pas de faire une statistique, ce qui est accessible à tout homme possédant un peu de patience ; mais il faut l'établir, ce qui est plus difficile, dans des conditions telles que l'on puisse en interpréter les résultats. En opérant sur des lignées, on aura donc plus de chances, si les conditions d'existence sont bien définies, de pouvoir dégager des conclusions utiles de la statistique (CHODAT, GUYE). Certains Biologistes ne manqueront pas d'objecter que de telles expériences ne rappellent que de loin ce qui se passe dans la nature. Cette objection est exacte, mais elle n'a qu'un faible intérêt. En effet, seules les conclusions des expériences simplifiées permettent d'interpréter avec quelque sécurité les phénomènes compliqués qui s'observent dans la nature, où, en raison du manque d'homogénéité du matériel étudié, « la fluctuation masque la tendance générale ». Et là, on ne peut pas dire que la loi des grands nombres masque la fluctuation.

Nous retrouvons une troisième complication dans le principe d'évolution qui domine toute la Biologie. Les sciences rationnelles peuvent postuler implicitement le principe de non-hérédité. La Microbiologie n'a pas ce droit. Le comportement des Bactéries est incontestablement « influencé par les expériences du passé » (RIGNANO).

Mais quelle que soit l'opinion métaphysique que l'on professe sur la contingence des lois de la nature, « la croyance en ces lois est une nécessité » (BOREL, 1928). Et le fait microbiologique nous paraît scientifiquement déterminé lorsqu'on l'observe à notre échelle, c'est-à-dire suivant des lois que nous connaissons et que nous espérons connaître de mieux en mieux. C'est ainsi que nous tendons de plus en plus à exprimer les processus vitaux en termes de physico-chimie, mais d'une physico-chimie « agrandie » au sens de GUYE (1922).

Les Bactéries étant des êtres vivants, nous avons dans cette voie un domaine immense à exploiter.

Comme toute expérimentateur moyen, j'ai adopté des théories explicatives qui stimulent la recherche et la rendent plus vivante et plus attrayante

(PICARD). Lorsque j'ai formulé des hypothèses d'une façon arbitraire, je me suis efforcée qu'il n'y ait « *pas entre elles de contradictions logiques* » (DUHEM). Mais j'ignore si j'ai atteint ce but, car l'expérience que j'ai acquise n'est pas suffisante pour manier avec aisance cet instrument délicat de travail qu'est l'hypothèse.

Certains penseront peut-être que mon étude est le reflet de l'enseignement de M. le Professeur LASSEUR. On m'excusera volontiers d'employer les arguments déjà invoqués par mon Maître, car dans ce domaine de Microbiologie générale si profondément fouillé par lui, il est difficile de trouver des points qui lui aient échappé et des arguments dont il ne se soit déjà servi ; il est peut-être encore plus malaisé pour un disciple de ne pas suivre les traces et la pensée de celui qui l'initia à la recherche. Je m'en excuse auprès du Maître qui, dans ses Conférences sur la recherche scientifique nous disait : « *expérimentez, observez, réfléchissez ; lisez et réfléchissez ; je ne veux pas substituer mes réactions aux vôtres.... tout travail scientifique doit porter l'empreinte de l'activité originale de l'esprit qui sent, analyse et médite.* »

Dans ces conférences, on retrouvait une vision intense de la Science, une conception hardie et séduisante de la recherche scientifique. La vue des élèves, une fois élargie pour observer la chose à la même échelle que l'œil du Maître, ne pouvait plus se resserrer à l'échelle d'un horizon trop restreint. C'est ainsi que j'ai étudié les Bactéries sans me préoccuper de savoir si la substance vit avec l'aide ou « *sans l'aide d'aucune force* » suprasensible au sens de RABAUD (1911). La solution de cette question est d'ordre métaphysique et si je la tranchais dans un sens ou dans l'autre, je tomberais dans un dogmatisme que j'ai toujours voulu éviter.

L'interprétation que j'ai donnée des faits est nécessairement personnelle ; elle est en harmonie avec les vues exposées dans nos publications antérieures. Mais il est bien évident que ces faits peuvent être susceptibles d'une autre interprétation et cela d'autant plus que le besoin d'enchaîner logiquement mes déductions m'a conduit souvent à une prudence excessive.



Si la division du travail a pu rendre nécessaire la distinction entre morphologie (anatomie, organographie...) et physiologie, il s'agit là de barrières artificielles élevées pour la commodité de la recherche ou de l'exposé entre des activités vitales diverses en apparence, mais inséparables dans l'être vivant ; en effet, lorsqu'on fait croître ou diminuer la taille d'une

Bactérie, lorsque l'on modifie sa forme par culture dans un milieu chimiquement défini, peut-on parler de morphologie ou de physiologie ? Il s'agit évidemment d'un phénomène biologique.

Tout en reconnaissant l'arbitraire de nos classifications, j'ai cependant, pour des raisons didactiques, séparé l'exposé de la morphologie de celui des caractères généraux de culture. Je m'excuse de l'inégal développement donné à chacune des diverses parties de ce travail dû à des préférences personnelles pour telle ou telle partie de la discipline microbiologique.

Si invoquant l'esprit positiviste, on m'objectait que j'aurais dû diriger mes efforts vers les recherches les plus utiles, en apparence, je répondrais que la condition première pour faire de la recherche désintéressée est d'y trouver un plaisir, la satisfaction intellectuelle étant une des « *fins intimes de la science* » (CAMPBELL) et « *Dans la science pure on ne développe guère l'esprit d'invention en faisant travailler sur commande* » (PICARD).

J'indique ci-dessous le plan d'exposition suivi dans ce travail.

PLAN D'EXPOSITION

PREMIERE PARTIE

Étude morphologique et biologique de *B. caryocyaneus*

BEIJERINCK-DUPAIX, 1930

I. — Origine, Habitat, Isolement.

MORPHOLOGIE.

- a) Formes, succession des formes.
- b) Organes de résistance, spores.
- b) Structure de la plastide.
- d) Mouvement, organe du mouvement.
- e) Dimensions.
- f) Coloration par la méthode de GRAM.

II. — Caractères de culture.

- a) Caractères généraux de culture.
- b) Culture de *B. caryocyaneus* sur milieux non chimiquement définis :
 - 1 — Milieux usuels ;
 - 2 — Milieux spéciaux.

c) Culture de *B. caryocyaneus* sur milieux chimiquement définis :

1 — Aliment minéral :

Influence du phosphore ;

Influence du magnésium ;

Influence du fer.

2 — Aliment hydrocarboné.

3 — Relation entre le pH du milieu et le pouvoir chromogène de *B. caryocyaneus*.

III. — Etude de la caryocyanine.

Rôle des pigments bactériens.

IV. — Action de différentes substances chimiques sur la vie de *B. caryocyaneus*.

V. — Action de *B. caryocyaneus* sur différents organismes vivants :

a) Pouvoir pathogène ;

b) Réactions anticorps.

VI. — Variation :

a) Modification fluorescente de *B. caryocyaneus* ;

b) Race achromogène de *B. caryocyaneus*.

VII. — Nomenclature. Place de *B. caryocyaneus* dans la classification.

DEUXIEME PARTIE

Recherches sur le mécanisme du phénomène
de CHARRIN et ROGER.

I. — Découverte de l'agglutination.

II. — Généralités sur le phénomène de CHARRIN et ROGER.

III. — pH et agglutination.

IV. — Facteurs de stabilité des suspensions microbiennes chauffées à 80° C.

V. — Variation de quelques paramètres au cours de l'agglutination :

- a) Tension superficielle;
- b) Différence de potentiel;
- c) Viscosité;
- d) pH;
- e) Conductibilité.

VI. — Abaissement expérimental de la tension superficielle et stabilisation des systèmes agglutinants par addition de substances tensio-actives.

*
* *

Dans ce mémoire j'étudierai une Bactérie chromogène isolée par BEIJERINCK et qui fut adressée à M. le Professeur LASSEUR par la « *National Collection of Type Cultures* » de Londres.

Je donnerai tout d'abord un aperçu de la vie de cette Bactérie chromogène, dans les milieux de culture et chez les êtres organisés.

B. caryocyaneus a été isolé du bois pourri d'un saule des environs de Delft. Cette Bactérie se présente sous la forme d'un bâtonnet à extrémités arrondies mesurant de $0\mu 8$ à $3\mu 6$ sur $0\mu 5$ — $0\mu 7$. Les éléments sont isolés ou réunis par 2, rarement on observe des filaments de 4 ou 5 éléments. *B. caryocyaneus* est très mobile, et possède un fouet polaire dont la longueur peut osciller entre $2\mu 5$ et 8μ . Il ne prend pas le Gram. Il est aérobic. La température optimum de culture de ce Bacille est comprise entre 20 et 25° C. La température maximum est voisine de 40° C. Elle varie, en effet, suivant les souches considérées. Sa résistance aux antiseptiques est moyenne puisque tout développement cesse pour des concentrations de 0,5 o/oo en acide phénique.

Une des caractéristiques de cette Bactérie est la production d'un pigment bleu passant au violet et devenant noir dans les vieilles cultures. *B. caryocyaneus* secrète, en outre, un pigment fluorescent vert. Suivant les milieux considérés, on observe l'apparition d'un seul pigment (bouillon, eau peptonée) ou la formation des deux corps colorés (milieu synthétique 1 de LASSEUR). On note les colorations les plus variées dans les cultures sur pomme de terre glycinée et sur lait où l'on remarque le bleu, le gris-bleu, le vert, gris-vert ou le noir suivant l'âge des cultures.

B. caryocyaneus est doué d'un pouvoir protéolytique intense (liquéfaction de la gélatine, peptonisation de l'albumine d'œuf et du lait...). Il fait

fermenter un certain nombre de glucides (glucose, galactose, xylose, arabinose). Il réduit les nitrates en nitrites, ne donne pas d'indol.

B. caryocyaneus s'est montré dépourvu de tout pouvoir pathogène pour la Souris, le Cobaye, le Lapin, la Grenouille.

L'inoculation aux végétaux a donné les mêmes résultats. Par contre, *B. caryocyaneus* est doué de pouvoirs agglutinogène et agglutinable hautement développés; il constitue même un matériel éminemment favorable à l'étude du mécanisme de la réaction de CHARRIN et ROGER. Cette particularité explique pourquoi j'ai consacré un temps aussi long à l'étude de l'agglutination sérique de *B. caryocyaneus*.

Pour la rédaction de ce travail, j'ai consulté un nombre tel de publications que l'énumération complète des références bibliographiques aurait exigé cinquante pages d'impression. J'ai donc été conduite à diviser la bibliographie en deux parties: la littérature générale et la littérature spéciale au sujet étudié. La littérature générale figure à la fin de ce volume et la littérature spéciale à la fin de chaque paragraphe ou de chaque chapitre.

PREMIERE PARTIE

**Étude morphologique et biologique
de *B. caryocyaneus* Beijerinck-Dupaix**

ÉTUDE MORPHOLOGIQUE ET BIOLOGIQUE DE *B. CARYOCYANEUS* BEIJERINCK-DUPAIX 1930

CHAPITRE PREMIER

ORIGINE - HABITAT - ISOLEMENT

En 1927, la *National Collection of Type Cultures*, Listers Institut de Londres adressa une culture d'un Bacille fluorescent, portant la dénomination de *B. caryocyaneus* Delft, à M. le Professeur LASSEUR qui, désireux d'avoir des renseignements sur ce Bacille, écrivit à M. le Professeur KLUYVER. Celui-ci répondit en ces termes :

« ...Je regrette infiniment de ne pouvoir vous donner de renseignements sur *B. caryocyaneus*. Je suis assez sûr que M. le Professeur BEIJERINCK, qui a isolé ce microbe et lui a donné son nom, n'a jamais publié un article à ce sujet. J'ai écrit à M. BEIJERINCK pour lui demander de me donner quelques informations. Peut-être alors me sera-t-il possible de revenir à votre question... »

Et, en effet, dans une seconde lettre, M. le Professeur KLUYVER précisa de la façon suivante les renseignements fournis par son éminent devancier.

« *Pseudomonas caryocyaneus* est étroitement apparenté à *Ps. pyocyaneus* GESSARD, mais constitue pourtant une espèce différente. J'ai isolé cette Bactérie de bois pourri d'un Saule aux environs de Delft. En outre, j'ai trouvé cette Bactérie quelques fois dans le moût d'une usine de levure et dans celui d'une brasserie. Le pigment bleu « caryocyanine » ressemble beaucoup à la pyocyanine, mais il est très instable et se transforme aisément en un pigment brun foncé. *B. caryocyaneus* fut isolé sur une plaque appropriée à l'isolement de l'*Azotobacter*. Ainsi j'obtenais des centaines de petites colonies fortement liquéfiantes et montrant un pigment bleu foncé. Pour obtenir le pigment bleu, il est préférable d'utiliser des plaques d'eau de conduite gélosée, contenant 2 % de glucose et 0,1 % de phosphate d'am-

monium, mais, là aussi, une coloration en brun se manifeste après quelque temps » (BEIJERINCK).

Dans ce mémoire, je m'efforcerai de faire une étude aussi complète que possible du germe isolé par BEIJERINCK et conservé par la *National Collection of Type Cultures* de Londres.

MORPHOLOGIE

Généralités.

La Microbiologie est une branche de la Biologie et à ce titre, elle connaît d'abord la forme. Il ne faut donc pas s'étonner si les descriptions d'un SCHRÖTTER ou d'un COHN font plus souvent appel à la morphologie des microorganismes qu'à leurs caractères de culture.

Aux temps héroïques de la Microbiologie, les moyens d'investigation microscopique dont disposaient les savants étaient assez limités, de plus, le matériel bactérien étudié n'était pas comparable à lui-même, car le problème de l'obtention de cultures pures était loin d'être résolu. C'est pourquoi nous voyons se dresser l'une contre l'autre les Ecoles célèbres de COHN et de NÆGELI.

COHN, avec la foi débordante de l'apôtre soutient que la forme est constante, tandis que NÆGELI avec un enthousiasme non moins ardent, admet un polymorphisme presque illimité. Si cette dualité de théorie suscita de nombreux travaux, il faut bien reconnaître que la notion de polymorphisme fut préjudiciable aux progrès de la Bactériologie, puisqu'elle conduisit, pendant un certain temps, à la négation de l'espèce en Microbiologie. De son côté, COHN ne put éviter les exagérations du novateur.

Les deux chefs d'Ecole auraient peut-être trouvé un terrain d'entente s'ils avaient fait intervenir les notions de culture pure et de temps.

M. le Professeur CUÉNOT pense qu'il pourrait y avoir deux sortes de variation :

1° une variation, la seule que conçoit le paléontologiste qui connaît bien les faits dans le temps et très mal dans l'espace. C'est ce que l'on pourrait appeler la variation totale ou mutation de WAAGEN; elle ne serait pas très différente de ce que ROSA et les auteurs italiens nomment Hologénèse, c'est-à-dire une transformation extrêmement lente, petite et continue de tous les individus d'une espèce. En d'autres termes, s'il existe une forme A au temps t , il y aura au temps t_1 une forme A_1 et il ne restera plus de formes A puisque tout sera transformé. Le paléontologiste dit que lorsqu'il examine des fossiles (molaires d'éléphants provenant de couches qui

se succèdent sans lacune), il lui est difficile ou impossible de tracer des lignes de démarcation spécifique tellement la variation est continue.

2° le biologiste, au contraire, qui ne connaît que la nature actuelle, c'est-à-dire l'espèce au temps t , ne conçoit ni ne constate la variation totale. La seule variation qu'il connaît avec certitude, c'est la variation nettement discontinue, très certainement partielle présentée seulement par certains individus, les mutants. Seuls quelques individus changent, le reste de l'espèce demeure tel qu'il est.

Les deux points de vue sont irréconciliables (*Communication verbale* (1) de M. le Professeur CUÉNOT).

Pour la majorité des naturalistes « *les êtres vivants subissent des changements véritables* » (RABAUD, 1922, p. 12) et LE DANTEC (1919), écrit : « *un animal qui vit, change sans cesse par cela même qu'il vit* ». (*La Mécanique de la vie*, p. 72). BRACHET (1917) admet lui aussi que les êtres vivants varient lorsqu'il écrit : « *Depuis les origines jusqu'à nos jours, les individus successifs d'une lignée donnée, au lieu de revêtir toujours exactement les mêmes formes et la même image se sont progressivement transformés.* »

On sait qu'un certain nombre de savants classent les sciences en faisant intervenir les notions primordiales de nombre, d'espace, de temps, de matière, de vie et de pensée (2).

Considérons la notion de temps. Dans l'étude morphologique d'une espèce bactérienne, on ne cherche à mettre en évidence que les variations rendues objectives dans un temps de l'ordre de jours. Par conséquent, on dira que la forme est constante si une Bactérie, réensemencée dans des conditions de culture aussi identiques que possible, offre des éléments qui paraissent semblables, et on dira que la forme n'est pas constante si deux cultures provenant d'une même plastide présentent un mélange de formes diverses se manifestant dès le début de la culture, par exemple dans la première période de 24 heures. Il ne faut pas oublier, en effet, que les Bactéries comme les êtres vivants peuvent présenter un cycle d'évolution. On peut par exemple, constater la présence de spores donnant naissance à un élément végétatif se multipliant par cloisonnement. Au bout d'un certain nombre de générations cet élément se transforme en sporange qui renferme l'organe de résistance. La spore de *B. subtilis* ou de *B. butyricus* ne ressemble en rien à la forme végétative, ni au sporange

(1) Que je crois avoir rapportée fidèlement.

(2) A. NAVILLE (1901), GUYE (1922), etc...

et cependant dans ce cas particulier, on ne serait pas plus autorisé à parler de pléomorphisme qu'on ne saurait l'être lorsqu'on compare les différentes images du développement du Blé, par exemple (1). Il est possible de retrouver un cycle d'évolution plus ou moins différencié même avec les germes non sporogènes (*B. chlororaphis*, Vibrion cholérique...). C'est un point sur lequel M. le Professeur LASSEUR a longuement insisté.

FORMES — SUCCESSION DES FORMES

Toute Bactérie se révèle à nos sens par une forme extérieure déterminée qui a longtemps constitué une base importante de la classification microbiologique; mais les Bactéries sont en contact direct avec les composants du milieu de culture, elles offrent donc une plasticité beaucoup plus grande que les organismes supérieurs et de ce fait on est obligé de faire une division arbitraire dans l'étude de la forme. Je considérerai donc la forme dans les conditions usuelles de culture et l'aspect morphologique du germe cultivé dans des conditions défavorables. Cette subdivision me paraît indispensable si on ne veut pas enlever toute signification à l'expression de « *forme normale* ». Dans les conditions défavorables, il y a en général des modifications de fonctions, diminution de la vitesse de croissance ou arrêt de la végétation, formation d'organes de conservation et apparition de plastides de formes nouvelles. Ainsi que le faisait justement remarquer WINOGRADSKY (1889) « *il me semble que c'est oublier ces principes, que d'interpréter dans le sens d'une variabilité, les modifications de développement observées dans les milieux antiseptiques, sans qualifier en même temps les modifications d'anormales.* »

La façon dont se comporte une Bactérie vis-à-vis d'un élément E ne doit pas être considérée comme une variation, mais comme une réaction de ce germe aux nouvelles conditions d'existence. A l'action d'un milieu défini, la Bactérie répond par une réaction déterminée.

Je vais donc étudier l'aspect que présente *B. caryocyanus* après des temps donnés, dans des conditions de culture diverses: 1° en milieux usuels et en milieux synthétiques; 2° en milieux additionnés de substance antiseptique; 3° à la température de 40° C.

(1) C'est afin d'illustrer ma pensée que j'utilise cette image, mais je ne veux en aucune façon assimiler la spore à la graine des végétaux supérieurs.

Auparavant j'envisagerai brièvement les conditions d'observation (I) et le mode de groupement des plastides.

CONDITIONS D'OBSERVATION

M. le Professeur LASSEUR attache une importance considérable à l'examen sur le frais ou à l'aide de colorants respectant la vitalité des Bactéries (colorations vitales qui ne doivent en aucune façon modifier, par exemple, le mouvement des plastides). Les expériences de précipitation ou de coagulation des colloïdes qui se poursuivent depuis longtemps au Laboratoire, m'ont montré combien il est difficile, sinon impossible, de fixer une plastide en respectant rigoureusement la structure de l'élément vivant. C'est pourquoi j'ai toujours utilisé dans mes examens microscopiques, des objectifs apochromatiques et des oculaires compensés avec des éclairages suffisamment gradués pour percevoir les fins détails de structure des plastides bactériennes. Ce mode d'examen est évidemment très pénible, même en éliminant toute lumière parasite; mais il a le gros avantage de correspondre à la structure de la Bactérie vivante. De même j'ai attribué une grande importance à l'examen ultra-microscopique effectué avec condenseur et cuves de quartz. Ce dernier examen m'a conduit à un certain nombre de conclusions relatives à l'existence de la membrane, par exemple.

MODE DE GROUPEMENT DES PLASTIDES COLONIES ELEMENTAIRES

Lorsqu'une plastide donne naissance à des plastides filles, tantôt les derniers éléments se détachent de ceux dont ils proviennent au fur et à mesure de leur formation, tantôt, ils restent associés, constituant des colonies élémentaires.

Sur les différents milieux: gélose, gélatine, solution de peptone, milieux synthétiques L_1 et L_2 , les plastides de *B. caryocyanus* sont le plus souvent isolées, parfois réunies par deux; on note quelquefois la présence

(1) Etant données les différences d'interprétation auxquelles peuvent donner lieu les images microscopiques et dans un but de contrôle, j'ai toujours eu soin de soumettre mes préparations à différentes personnes et de leur demander de bien vouloir me décrire ce qu'elles voyaient sans leur faire part de ce que j'avais observé.

de filaments de 3 ou 4 éléments et plus rarement encore, les éléments restent unis en longs filaments. Dans ce dernier exemple, on constate que les plastides sont entourées d'une gaine (1), hyaline, transparente, dans laquelle sont implantés les éléments bactériens. Par ce caractère, *B. caryocyaneus* se rapproche plus des Algues que des Champignons. Les filaments se rencontrent surtout dans les voiles provenant de cultures sur milieu liquide; ils sont en général très fragiles et, pour les observer, il faut dissocier le voile avec beaucoup de précautions; sous ces réserves, les filaments peuvent atteindre la longueur d'un champ microscopique.

FORME DANS LES MILIEUX USUELS ET DANS LES MILIEUX SYNTHETIQUES

B. caryocyaneus, examiné sur le frais ou après coloration vitale (2), se présente sous la forme d'un bâtonnet droit ou légèrement arqué. On peut distinguer le plus souvent deux types d'éléments A et B d'inégale fréquence. Les éléments du type A, les plus nombreux, sont allongés et constitués par deux troncs de cône ou par deux cônes opposés par leur base. Les éléments du type B sont représentés par des plastides trapues, plus courtes et plus larges que les plastides du type A. De plus, leurs extrémités sont arrondies.

Les travaux de GUILLIERMOND (1908), Arthur MEYER (1912), et ses élèves, M. et Mme HOLLANDE (1928-1929-1930-1931) ont établi l'existence de la membrane chez les Bactéries. Pour Arthur MEYER, la membrane est formée de deux parties, l'une pauvre en eau et riche en matière sèche, l'autre très riche en eau et pauvre en matière sèche. L'exagération de la deuxième partie conduit à la formation de la capsule. Or, on sait qu'il n'est pas toujours facile de mettre en évidence la capsule des Bactéries (3). L'expérience a démontré que la capsule est plus facilement perceptible lorsqu'on utilise, comme milieu d'observation, non pas l'eau, mais l'eau

(1) L'examen d'un fragment de voile d'une culture de Bacille tuberculeux montre que les plastides sont réunies par une matière que KOCH a signalé et que STRAUSS aurait désigné sous le nom de « *matière unissante* ». J. AUCLAIR et L. PARIS (1907) considèrent cette substance comme une cellulose. Je n'ai pas observé de faits analogues avec les voiles de *B. caryocyaneus*.

(2) Il s'agit bien d'une coloration vitale, car les germes très peu colorés ont conservé toute leur motilité, et de ce fait ne doivent pas avoir subi d'altération bien importante.

(3) Capsule positive et capsule négative du Pneumocoque.

additionnée de matière protéique. On ne sera donc pas étonné si la couche externe de la membrane de *B. caryocyaneus* se perçoit avec plus ou moins de netteté suivant le milieu d'observation. Dans les conditions habituelles de culture, les plastides de *B. caryocyaneus*, examinées sur le frais, entre lame et lamelle, sont entourées d'une auréole hyaline plus ou moins perceptible. Tandis que sur le produit visqueux de liquéfaction de l'albumine coagulée, la capsule se détache admirablement bien.

Y a-t-il eu augmentation véritable de l'épaisseur de la couche externe, ou cette augmentation n'est-elle qu'apparente et doit-elle être attribuée au milieu d'observation ?

Il semble bien que la première hypothèse est exacte, car, même après lavage, la capsule est plus visible chez les Bactéries cultivées sur milieu albumineux que chez les germes cultivés sur milieux usuels (1).

FORME

DANS LES CONDITIONS DEFAVORABLES DE CULTURE

MILIEU PHÉNIQUÉ. — L'aspect de *B. caryocyaneus* en eau peptonnée phéniquée est variable suivant les cultures et l'âge de ces dernières. A côté de grandes formes, de dimensions supérieures à celles que l'on observe dans les milieux normaux, on trouve par contre des plastides extrêmement petites, si petites que nous avons songé à isoler, par filtration, ces éléments des grandes formes. Remarquons tout de suite que ces tentatives ont été infructueuses.

En milieu phéniqué, la population est surtout représentée par des diplobacilles formés d'éléments tronconiques qui, à l'examen sur le frais (immersion), se détachent sous la forme de cônes légèrement verdâtres entourés d'une auréole blanche. Un fait assez curieux qui s'observe particulièrement bien en milieu phéniqué, c'est la présence d'un pont de cytoplasme reliant les deux plastides. Lorsque le couple se déplace, la plastide dirigée à l'avant n'est animée que d'un mouvement de translation, tandis que la plastide arrière décrit des cônes de révolution ou des oscillations très saccadées.

MILIEU LITHINÉ. — Parmi toutes les observations faites sur les

(1) Il est vrai qu'il pourrait y avoir enrobage des plastides par la substance protéique, analogue à celui que l'on observe dans la protection des particules colloïdales, enrobage qui persisterait après lavage.

modifications des Bactéries sous l'influence des électrolytes, celles de GAMALEIA (1894) offrent un intérêt particulier. S'inspirant des travaux du savant bactériologiste, LASSEUR (1911) est arrivé, par culture sur gélose lithinée, à faire acquérir une très belle capsule à *B. chlororaphis*. De même, S. SEGRE (1931) a observé des modifications morphologiques et physiologiques du Colibacille sous l'influence du chlorure de lithium (1).

Il était donc d'autant plus intéressant de rechercher si *B. caryocyaneus* accentuerait la formation de la capsule en présence de ce métal, que Li est le plus hydratable de tous les cations.

Les premiers essais ont été effectués en cultivant *B. caryocyaneus* sur milieu synthétique L₁ additionné de doses croissantes de chlorure de lithium variant de 0,1 à 2 gr. pour cent.

Les cultures âgées de 48 heures montrent (à la concentration de 2 % en chlorure de lithium) de nombreux filaments constitués par 10 à 15 plastides. Ces filaments sont entourés d'une gaine particulièrement nette. Montées dans une solution aqueuse de Rouge de Magdala, les plastides sont colorées en violet rouge et l'auréole est rose. De plus, cette coloration montre l'existence d'un pont de cytoplasme, reliant les deux éléments constituant un diplobacille.

De nouveaux essais ont porté sur des cultures faites en milieu lithiné.

L'addition de chlorure de lithium à la gélose nutritive (2) (gélose peptone ou gélose bouillon de pH = 7) détermine, chez *B. caryocyaneus*, l'apparition d'une magnifique capsule autour de chaque plastide. Cette auréole se colore facilement (voir planche A; figure 3) à l'aide de la solution de Fuchsine formolée (3) proposée par A. MEYER (1912) et ses élèves.

On note aussi la présence de filaments assez abondants. Chaque filament est formé d'un nombre variable de plastides. Certains filaments montrent de 3 à 4 éléments, d'autres de 10 à 15 plastides. Dans ce cas, l'ensemble des

(1) Récemment, K. PIETSCHMANN et A. RIPPEL ont étudié les formes qu'offrent certaines Bactéries dans des milieux additionnés de sulfate de lithium.

(2) Gélose nutritive 100 cm³, chlorure de lithium 2 gr.

(3) La solution colorante utilisée était obtenue en ajoutant 10 volumes de la solution commerciale de formol (à 40 %) à 90 volumes d'une solution de fuchsine à 0,22 % de façon à ce que la solution formolée renferme sensiblement 0,2 % de fuchsine. Pour la coloration du matériel, on opère de la façon suivante : dans une série de petits tubes on dépose 1 cm³ de la suspension bactérienne à étudier, à chacun des tubes, on ajoute des quantités croissantes de solution de fuchsine formolée. L'examen méthodique de toutes ces suspensions ainsi colorées détermine la concentration pour laquelle la capsule est parfaitement mise en évidence.

Fig. 1. — Culture de 48 heures sur milieu synthétique L₁. Préparation, entre lame et lamelle, colorée au bleu de toluidine en solution aqueuse à 10/100. Examinée avec l'objectif 1,5 de ZEISS (apochromatique) et l'oculaire compensateur K 8 (10 ×) ZEISS. Les plastides sont colorées en violet rouge parce que le milieu synthétique L₁ qui a été emporté avec le voile bactérien a fait virer le bleu de toluidine.

Fig. 2. — Culture de 48 heures sur milieu synthétique L₁. Préparation, entre lame et lamelle, colorée au bleu de Nil (sulfate) en solution aqueuse à 10/100. Examinée avec l'objectif 1,5 de ZEISS (apochromatique) et l'oculaire compensateur (10 ×) ZEISS; dessinée à l'aide de la grande chambre claire de ZEISS.

Fig. 3. — Culture de 7 jours sur gélose lithinée. Préparation entre lame et lamelle, colorée à la fuchsine formolée; examinée et dessinée dans les mêmes conditions que la figure 2.

Fig. 4. — Culture de 48 heures sur gélose lithinée. Préparation entre lame et lamelle, colorée, examinée dans les mêmes conditions que la figure 3 et dessinée à une autre échelle.

Echelle : 19 millimètres = 10 μ .

Fig. 1. — Culture de 48 heures sur milieu synthétique L. Préparation, entre lame et lamelle, colorée au bleu de toluidine en solution aqueuse à 1 0/00. Examinée avec l'objectif 1,5 de Zeiss (apochromatique) et l'oculaire compensateur K 8 (10 X) Zeiss. Les plastides sont colorés en violet rouge parce que le milieu synthétique L, qui a été emporté avec le voile bactérien a fait virer le bleu de toluidine.

Fig. 2. — Culture de 48 heures sur milieu synthétique L. Préparation, entre lame et lamelle, colorée au bleu de Nil (sulfate) en solution aqueuse à 1 0/00. Examinée avec l'objectif 1,5 de Zeiss (apochromatique) et l'oculaire compensateur (10 X) Zeiss, dessinée à l'aide de la grande chambre claire de Zeiss.

Fig. 3. — Culture de 7 jours sur gélose lithinée. Préparation entre lame et lamelle, colorée à la fuchsine formolée; examinée et dessinée dans les mêmes conditions que la figure 2.

Fig. 4. — Culture de 48 heures sur gélose lithinée. Préparation entre lame et lamelle, colorée, examinée dans les mêmes conditions que la figure 3 et dessinée à une autre échelle.

Echelle : 10 millimètres = 10 μ .

PLANCHE A

B. CARYOCYANEUS BEIJERINCK DUPAIX



FIG. 1



FIG. 2



FIG. 3

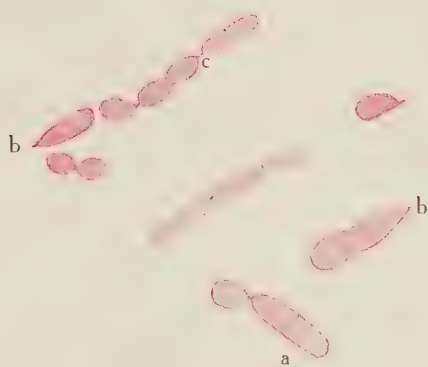


FIG. 4

plastides se trouve entouré d'une gaine et l'on obtient des images qui rappellent celles des « *Bactéries filamenteuses* ».

Les dimensions des plastides sont très variables; on peut observer des éléments très courts, presque ronds, puis d'autres ovalaires, enfin des plastides allongés. Dans cette dernière catégorie de Bactéries, on rencontre des formes géantes, éléments cylindriques de taille beaucoup plus grande que celle des plastides provenant de milieu normal. Chez toutes ces plastides, l'aspect vacuolaire est assez prononcé. Il faut signaler en outre un fait assez curieux : c'est la présence de filaments constitués par 10 à 15 plastides dont la plastide médiane mesure de 5 à 6 μ de longueur, les autres éléments ne dépassant pas 1 μ de longueur (1).

Pour expliquer l'allongement ou le raccourcissement des plastides sous l'influence du milieu extérieur, les auteurs allemands établissent une relation entre l'énergie de division et l'énergie de croissance. Dans mes expériences, la règle de balancement entre l'énergie de division et l'énergie de croissance est incapable d'expliquer les faits observés. On peut penser à une impureté, les plastides ayant été par hasard placées bout à bout, comme cela s'observe dans l'agglutination en filaments (*Fadenreaktion*); mais cette hypothèse ne peut être soutenue, car l'examen microscopique attentif montre qu'il s'agit bien d'une file de plastides (2) incluses dans une même gaine. D'ailleurs, les cultures qui ont servi dans ces expériences proviennent d'une plastide unique.

Si, à l'examen microscopique, on substitue l'examen ultramicroscopique, on obtient des indications bien plus précises en ce qui concerne la forme et la structure des éléments bactériens. D'ailleurs, dans ce mode d'observation, l'emploi de cuves de quartz, d'un condensateur cardioïde en quartz, d'une immersion apochromatique à la glycérine et d'un oculaire réglable K 20 x permet d'obtenir un champ parfaitement sombre. Dans ces conditions d'examen, les plastides se présentent sous des formes différentes, les unes courtes, les autres plus allongées et droites à extrémités acuminées ou arrondies, d'autres enfin légèrement arquées. Chez toutes ces plastides, la membrane se dessine sous la forme d'une ligne très brillante, qui paraît plus épaisse chez les formes courtes que chez les formes allongées. A l'intérieur de la plastide, on observe des grains très brillants. Dans cer-

(1) Sur gélose bouillon ou sur gélose peptone (pH = 7), *B. caryocyanus* se présente sous forme de bâtonnets dont la longueur oscille entre 0,8 μ et 3,6 μ .

(2) L'obtention de suspensions homogènes à partir des germes cultivés sur gélose lithinée est très difficile, en raison du développement important de la capsule et de la présence de filaments.

tains cas, on note un gros grain latéral, d'autres fois, deux grains latéraux correspondant à un étranglement de la plastide (cloisonnement). Très souvent, la plastide possède un grain polaire et deux grains latéraux. Si le nombre des grains est beaucoup plus grand, la plastide offre un aspect granuleux; dans ce cas, la partie optiquement vide est extrêmement réduite. Les grains peuvent être sur des plans différents. En ce qui concerne la coloration, certains grains sont blanc-bleuâtre, d'autres blanc-jaunâtre.

La capsule, très visible au microscope, se montre délimitée par une fine ligne brillante. Il est à remarquer que, lorsque les plastides ne sont pas altérées d'une façon quelconque par un fixateur, la capsule est limitée par une ligne continue, régulière. Avec A. MEYER, je pense que la capsule n'est qu'une modification de la partie externe de la membrane.

CULTURE A 40° C.

L'examen microscopique des cultures (1) de *B. caryocyanus* ayant subi plusieurs passages sur milieu synthétique L₁ à 40° C, révèle la présence de plastides isolées ou réunies par deux.

A côté de ces germes, on rencontre des filaments formés soit de 10-12 plastides, soit de 3 à 4 éléments. La taille des plastides constituant les filaments est irrégulière. Comme dans les conditions habituelles de culture, on distingue deux types de plastides : les unes courtes et les autres allongées. Toutes les plastides sont entourées d'une zone hyaline très nette; cette formation est cependant plus perceptible chez les plastides courtes que chez les plastides allongées, notamment après coloration vitale au Bleu de toluidine. Dans ce dernier cas, le cytoplasme de certaines plastides est coloré en bleu. On perçoit à l'intérieur de la plastide des grains colorés en rose. Ces grains peuvent probablement être homologués aux grains métachromatiques des auteurs. Chez d'autres plastides, le cytoplasme paraît coloré en violet-rouge et on observe un grain coloré en bleu, rond ou ovalaire de diamètre presque égal à celui de la plastide. Dans ce cas particulier, il ne semble pas que l'on ait affaire à un grain métachromatique.

Pour une concentration convenable en Bleu de toluidine, certaines cellules montrent des vacuoles occupant la moitié ou les deux tiers de la plastide. Ces vacuoles s'observent plus particulièrement dans les plastides

(1) Agées de cinq jours,

ovulaires ou arrondies. Dans les plastides allongées, on note en général 2 ou 3 vacuoles séparées par des ponts de cytoplasme.

FORMES DE RESISTANCE. — SPORES

JIROU (1901) aurait observé la présence d'organes de résistance dans les cultures de quatorze Bacilles fluorescents, parmi lesquels il a rangé *B. chlororaphis*.

LASSEUR (1911) a montré que l'hypothèse de JIROU n'était pas soutenable en ce qui concerne *B. chlororaphis*; mais quelques auteurs ont signalé la présence de spores chez *B. syncyanus*. Or, cette Bactérie peut être rapprochée de *B. caryocyaneus*. J'ai donc recherché systématiquement si, à un moment donné de son existence, le Bacille que j'étudie peut offrir des formes de résistance.

Tout d'abord, je n'ai jamais rencontré les formations très réfringentes (rondes ou ovulaires) (1) que l'on observe si fréquemment chez les Bactéries du groupe *subtilis-mesentericus-megatherium*. De plus, les méthodes de ZIEHL et d'ALESSANDRINI n'ont pas décelé la présence d'éléments acido-résistants, même dans les très vieilles cultures de *B. caryocyaneus*. En outre, chaque fois que j'ai suivi la descendance d'une seule plastide, j'ai toujours observé une multiplication par cloisonnement transversal et jamais d'image de germination.

En plaçant les éléments bactériens dans des conditions défavorables de culture, la végétation est ralentie ou arrêtée, les Bactéries peuvent même être tuées; mais on n'assiste pas à la formation d'organes de résistance analogues à ceux des Bactéries endosporées.

Enfin, les plastides sont toujours détruites par un chauffage de 10 minutes à 56° C., quel que soit l'âge de la culture considérée (2).

Dans toutes les conditions de vie où il m'a été donné d'observer *B. caryocyaneus*, ce germe s'est donc comporté comme une Bactérie asporogène.

BIBLIOGRAPHIE

BEAUVERIE (J.). — *Bull. Soc. Bot.*, t. 72, p. 1012-1017, 1925.

JIROU (J.). — *Journ. de Physiol. et de Pathol. génér.*, t. III, p. 188, 1901.

LASSEUR (Ph.). — *Thèse sciences naturelles*, Nancy, 1911.

(1) Possédant une coloration légèrement verdâtre.

(2) Age variant de 1 à 35 jours.

STRUCTURE DE LA PLASTIDE

Dans une plastide de Bactérie asporogène, on peut considérer :

- 1) la membrane et la capsule ;
- 2) le cytoplasme avec les inclusions (grains de graisse, de glycogène, de volutine) et les vacuoles ;
- 3) le noyau ou la formation équivalente ;
- 4) les fouets.

L'étude systématique de chacune de ces parties constituerait un mémoire très important, aussi n'étudierai-je avec détail, chez *B. caryocyaneus*, que les formations plus particulièrement visibles : la membrane, la capsule, les vacuoles et les fouets. Pour l'ensemble des autres parties, je me contenterai d'un résumé. En ce qui concerne les organes moteurs, la mise en évidence des fouets et l'étude du mouvement feront l'objet d'un chapitre spécial.

Avant de décrire avec détails la structure des plastides de *B. caryocyaneus*, je rappellerai, sous forme de généralités, comment les différents auteurs ont envisagé la structure des plastides bactériennes.

GÉNÉRALITÉS SUR LA STRUCTURE DES PLASTIDES BACTÉRIENNES

MEMBRANE.

L'étude de la membrane chez les Bactéries doit tenir compte des faits suivants : les Bactéries sont en général près de la limite de la visibilité. Il s'ensuit que les observations microscopiques impliquent un coefficient personnel très important, d'où les nombreuses contradictions relevées dans la littérature spéciale.

Les Bactéries ou Schizomycètes ont été envisagées par NAEGELI, EHRENBURG, COHN, SCHRÖTTER du point de vue botanique et dès les premiers temps de la bactériologie on a signalé la membrane des Schizomycètes.

D'autre part, ZOPF, de BARY, MIGULA, P. VUILLEMIN, GUILLIERMOND, PÉNAU, M. et Mme HOLLANDE décrivent la membrane chez de nombreuses Bactéries.

Jusqu'en 1897, l'existence de la membrane ne fut mise en doute par personne, et FISCHER (1895) admettait que toutes les Bactéries se composent d'une membrane et d'un protoplasme ; mais, en 1897, ZETTNOW déclare

qu'il lui a été impossible de voir une membrane chez les Spirilles et chez *B. granulosus*. L'auteur rejette la notion de membrane. Dès 1891, ZETTNOW, utilisant les méthodes de coloration des fouets, arrive à considérer deux parties chez les Spirilles : une partie centrale se colorant d'une façon intense, et une partie périphérique très difficilement colorable. La partie périphérique constitue le « *plasma* » (protoplasma) et la partie centrale, le noyau.

En 1902, BUTSCHLI considère la plastide de *Spirillum volutans* comme formée par un corps central régulièrement coloré et offrant des grains. Ces grains constituent la partie la plus importante de la plastide. Le corps central est entouré d'une bordure étroite non colorée, à structure alvéolaire et, en 1899, ZETTNOW proposait le terme d'*ectoplasma* pour désigner la partie du plasma qui n'est perceptible qu'après mordantage et coloration de la plastide, le nom d'*entoplasma* étant réservé à la partie du plasma qui se colore en bleu par la méthode de ROMANOWSKI. GOTSCHLICH (1912) se range aux conclusions de ZETTNOW.

EISENBERG (1909) fait une subdivision dans l'ectoplasme. Pour lui, l'ectoplasme de ZETTNOW comprend une membrane et une couche corticale.

Il est curieux de constater que tous les auteurs modernes qui parlent d'ectoplasme paraissent attribuer à EISENBERG une théorie qui doit être imputée en réalité à ZETTNOW et qui fut déjà en partie démembrée par EISENBERG. Or, en 1918, ZETTNOW revient sur sa conception première, l'auteur admet l'existence de la membrane, même chez les Spirilles ; mais il déclare ne pouvoir préciser nettement le rapport qui doit exister entre l'ectoplasme tel qu'il l'a défini autrefois et la membrane telle qu'il la conçoit aujourd'hui (1).

Discussion. — Il faut noter tout d'abord qu'en ce qui concerne les figures de BUTSCHLI qui paraissent conformes à la théorie de ZETTNOW, il ne semble pas douteux, comme le fait remarquer A. MEYER, qu'il s'agisse d'un artifice de préparation dû à la superposition de deux corps microbiens.

Remarquons d'ailleurs qu'on ne peut pas décider de la validité d'une théorie en s'appuyant sur un résultat négatif. Si ZETTNOW n'a pas observé la membrane des Spirilles, il doit accuser sa technique et ne pas mettre en doute la réalité d'une formation périphérique qui a été vue et décrite par un si grand nombre d'auteurs et chez des Bactéries les plus diverses.

(1) NAKANISHI (1901) considère bien deux couches dans le cytoplasme : l'ectoplasme et l'entoplasme, mais il ne confond nullement l'ectoplasme avec la membrane, cette dernière étant une formation plus ou moins rigide.

La membrane a été observée par HEIM chez *B. cyanogenes* (plasmolyse à l'aide de l'acide phénique) par EMMERICH et SAIDA (1900) chez *B. anthracis* (par action de la pyocyanase) par ELLIS (1902), chez *Sarcina ureae*, *Spirillum volutans*. ELLIS fait remarquer que la membrane peut être mise en évidence à l'aide de la Fuchsine phéniquée, le brun BISMARCK, le Bleu de méthylène, la Safranine, et il s'inscrit en faux contre les assertions de ZETTNOW.

La membrane a encore été perçue par RUZICKA (1904) chez *B. anthracis*, par SWELLENGREBEL (1907) et FUHRMANN (1910) chez *Spirillum volutans*. FUHRMANN insiste même sur le fait que la membrane est « bien caractérisée ».

A. MEYER (1912), dont les belles recherches n'ont pas assez retenu l'attention des bactériologistes a consacré de nombreuses et importantes publications à la structure de la cellule bactérienne. Si la notion du noyau a longuement intéressé l'illustre savant, il serait injuste de ne pas reconnaître la contribution qu'il a apportée à la question de la membrane.

A. MEYER met la membrane en évidence :

1) chez *B. asterosporus* dans les bâtonnets germinatifs : a) en utilisant l'action combinée du nitrate de potassium et de la solution iodo-iodurée, c'est-à-dire par plasmolyse et coloration ; b) à l'aide du Bleu de méthylène et de la Fuchsine formolée ;

2) chez *B. tumescens* par coloration au chloro-iodure de Zinc.

3) chez *Bact. Pasteurianum* HANSEN, dans cet exemple, la membrane est colorée en bleu, tandis que le reste du « protoplaste », fortement contracté, est coloré en jaune. GRIMME (1902) utilisait une double coloration pour observer la membrane de *B. cohaerens*. D'ailleurs bien avant ces savants, FISCHER en 1895 publie des figures où la présence de la membrane est incontestable.

De même Ch. HOLLANDE et G. CRÉMIEUX (1928-1931), ont démontré l'existence de la membrane et sa mise en évidence par le Bleu de Nil en solution aqueuse à 0,2 %, chez le Bacille de KOCH, le Bacille typhique, *B. anthracis*, ainsi que chez *Blattabacterium Cuenoti* (HOLLANDE et FAVRE, 1931).

Même chez les éléments où la membrane n'est pas une formation perceptible microscopiquement, on admet l'existence d'une couche orientée [exemple des hématies (LECOMTE DU NOUY)] et la présence d'une membrane explique un grand nombre de faits observés dans la nutrition des Bactéries,

dans l'infection, etc... qui demeureraient inexplicables si l'on ne faisait pas intervenir cette formation périphérique.

« On est donc autorisé à supposer que chaque cellule s'entoure d'une couche physiquement, tout au moins, différente des couches sous-jacentes; cette couche limitante constitue la barrière entre les cellules identiques, mais conservant chacune leur individualité; cette couche doit exister ne fût-ce que grâce à la loi réglant la différenciation d'une couche homogène au contact des phases diverses. » (W. KOPACZEWSKI, 1931, p. 283).

CAPSULE.

A. MEYER avec la majorité des auteurs considère la plastide bactérienne comme formée d'une masse protoplasmique entourée d'une membrane. Pour le savant allemand cette membrane comprend deux parties: une partie très mince, riche en matière sèche, très réfringente, facilement colorable qui correspond à la membrane des bactériologistes; l'autre partie, pauvre en matière sèche, peu réfringente, difficilement colorable, se rétractant considérablement sous l'action de la chaleur ou des fixateurs, constitue la couche mucilagineuse ou gommeuse et correspond à la capsule des bactériologistes. Il est assez difficile de se prononcer sur la relation qu'établit A. MEYER entre ces deux parties. En effet, en 1897 il écrit: « Il n'y a aucune raison d'admettre que les couches gommeuses extérieures proviennent de la membrane par gonflement, on a plutôt l'impression qu'il s'agit d'une sécrétion du mucilage à travers la membrane » (p. 157) et en 1912 A. MEYER pense que: « la couche mucilagineuse des Bactéries paraît résulter du gonflement des couches extérieures de la membrane » (p. 159).

Quelle que soit l'origine de la couche mucilagineuse ou gommeuse, elle est pauvre en matière sèche, pauvre en protéines, elle n'est pas fixée par les fixateurs ordinaires du cytoplasme et elle se contracte par la dessiccation et sous l'influence de nombreux fixateurs. En sorte que l'auréole claire que l'on observe autour des Bactéries montées dans un liquide albumineux ne correspond pas à la capsule, mais à un espace vide qui reste après contraction de la capsule. C'est bien ainsi que MIGULA comprenait les choses.

Pour la majorité des auteurs, le nombre des Bactéries capsulées est restreint (Pneumobacille, Pneumocoque, *B. anthracis*, *Leuconostoc*, etc...). Pour certains auteurs (KRUSE, 1896; MIGULA, 1896; BONI, 1900; GOTSCHLICH, 1903-1911, etc...), la capsule peut être mise en évidence chez un grand nombre de germes.

Ces divergences d'opinion tiennent aux erreurs d'expérience. Il est de

notion classique que les Bactéries incontestablement capsulées telles que le Pneumocoque ou le Pneumobacille perdent leur capsule dans les milieux dépourvus d'albumine et l'on admet volontiers que l'albumine et les hydrates de carbone favorisent (1) la production et la mise en évidence de la capsule (CIANI, 1911-1913). Les travaux de ROTKY (1914) semblent démontrer que l'influence de l'albumine et des sucres a été considérablement exagérée. Quoiqu'il en soit, il ressort de la littérature que la perception de la capsule varie avec le milieu de culture. Afin de préciser l'importance de ce facteur il est nécessaire d'opérer sur des corps microbiens rigoureusement débarrassés de tout milieu nutritif (2).

La nature de la capsule a suscité de nombreuses recherches et l'on a considéré la capsule comme étant :

1) un gonflement de la couche externe de la membrane (MIGULA, 1896; BINAGHI, 1898).

2) une transformation par hydratation de la couche la plus externe de la membrane, les couches les plus internes étant sans cesse renouvelées par l'activité du « *protoplaste* ». (FISCHER, 1903).

3) une réaction chimique de l'ectoplasme (EISENBERG, 1908-1911).

4) la conséquence du gonflement de l'ectoplasme (ZETTNOW, 1899).

5) la couche la plus interne d'une formation périphérique croissant en épaisseur et se gélifiant dans la partie externe (DE BARY, 1884).

6) une enveloppe de gelée qui s'est gonflée sous l'influence des humeurs (SOBERNHEIM, 1913).

7) une formation à structure radiée (HAMM, 1907).

8) une partie intégrante de la cellule bactérienne que l'on peut mettre en évidence dans toutes les circonstances (KERN, HINTERBERGER).

De même la composition chimique attribuée à la capsule varie suivant les auteurs, c'est ainsi qu'elle serait constituée par :

1) une couche albuminoïde (MIGULA, 1897).

(1) Pour KODAMA (1913), un milieu très alcalin et albumineux conviendrait à la mise en évidence de la capsule chez le Bacille du charbon et BONI (1900) préconise l'emploi de solution d'albumine glycinée.

(2) A ma connaissance, aucune étude systématique de ce genre n'a été tentée.

2) un mélange de substance protéique et de substance inconnue (CARPANO, 1913).

3) de la nucléalbumine (HAMM, 1907).

4) du galactane (TOENNIESSEN, 1920).

5) du mucilage (LEHMANN et NEUMANN, 1907).

La capsule aurait été mise en évidence chez de nombreuses Bactéries : Pneumocoque, Pneumobacille (BONI, 1900; TOENNIESSEN, 1912; HOLMAN, 1915); Streptocoque (BONI, 1900; HAMM, 1907); Staphylocoque (BONI, 1900; MARASSINI, 1913); Bacille du charbon (BONI, 1900; HAMM, 1907; KODAMA, 1912-1913; TOENNIESSEN, 1912; CIANI, 1913; MARASSINI, 1913); Bacille typhique (BONI, 1900; KUHNMANN, 1911; MARASSINI, 1913; RIEMSDIJK, 1921) *B. susepticus* (PREISZ, 1897; GOZONY LAJOS, 1913). *Colibacille* (Boni, 1900). *B. subtilis* (BONI, 1900; MARASSINI, 1913). *B. megatherium* (BONI, 1900). *B. mesentericus* (RIEMSDIJK, 1921). *B. mycoides* (BONI, 1900); Bacille diphtérique (BONI, 1900); Vibron cholérique (MARASSINI, 1913); Bacille dysentérique de SHIGA (RIEMSDIJK, 1921); *Sarcina flava* et *Sarcina alba* (BONI, 1900); *Tetragène* (HAMM, 1907). *Leuconostoc* (SMIT, 1917), etc...

La liste des Bactéries capsulées n'est peut-être pas aussi longue que semble le faire croire l'énumération ci-dessus; mais je ne pense pas être contredite en affirmant que le Pneumocoque et le Pneumobacille sont des germes capsulés. Or, la capsule de ces deux microorganismes ne s'observe que dans les humeurs des animaux infectés. En culture les mêmes microorganismes paraissent dépourvus de capsule. De là est née l'idée que le milieu albumineux était indispensable à la production et à la perception de la capsule. Aussi a-t-on conseillé d'examiner le matériel bactérien, provenant de cultures non albumineuses, dans un liquide additionné soit de sérum, soit d'ovalbumine (méthode préconisée par BONI, BUERGER, KODAMA).

Les méthodes utilisées pour la mise en évidence des capsules sont extrêmement nombreuses et elles sont assez différentes les unes des autres pour qu'il soit impossible de les résumer dans un tableau dichotomique. Tout au plus peut-on faire quelques grands groupes. A côté de ces groupes, il reste des méthodes qui ne peuvent être classées. La multiplicité de ces techniques est la meilleure preuve de la relativité de leur valeur. Le tableau ci-dessous indique quelques noms d'auteurs ayant préconisé des méthodes de mise en évidence de la capsule.

TABLEAU I.

Méthodes fondées sur la réduction des sels d'argent : VAN ERMINGEN, WOLOSCHIN.

Méthodes utilisant des solutions colloïdales	inorganiques (collargol) : HAMM.	
	Encres de Chine : ERRERA, BURRI, HARDOUIN, TOENNIESSEN, GOZONY LAJOS, HOLMAN. Protargol : KAUFFMANN, RIEMSDIJK.	
	organiques	VINCENT (Glycérine, NaCl-acide phénique; Bleu de méthylène phéniqué). LASSEUR (piciformol; potasse-tanin - Fuchsine). BUERGER (liq. de MUELLER; Violet de méthyle ou Fuchsine). BONI (ZIEHL; Bleu de méthylène de LÖFFLER).
		WADSWORTH (formol; Violet de gentiane aqueux). HAMM, WEIDENREICH (acide osmique; Giemsa). MEDALIA (HgCl²; Bleu de méthylène alcalin). MUIR (HgCl² — alun de potasse — tanin; Eosine). ROSENOW (tanin; Violet de gentiane; IKI; alcool). HONTOON (acides phénique, lactique, acétique; Fuchsine).
		WELCH (acide acétique; Violet de gentiane). HISS (Violet de gentiane; SO²Cu). OLT (solution de Safranine).
		etc..
Autres méthodes	Fixation par des agents chimiques	
	Fixation par la chaleur	

La plupart de ces méthodes comportent de nombreuses causes d'erreur. C'est ainsi que HAMM (1907) ne retrouve la capsule que chez un très petit nombre de Bactéries (Tétragène, Pneumocoque, Bacille du charbon) lorsqu'il utilise la méthode signalée dans le tableau ci-dessus. Par contre, lorsque ce savant, emploie la méthode de BONI, il arrive aux mêmes résultats que l'auteur italien et observe la capsule chez de nombreux germes. Aussi HAMM considère-t-il la méthode de BONI comme entachée d'erreur.

Il en serait de même de la méthode à l'encre de Chine. Tel est du moins l'avis de HADLEY, BRYANT et ELKINS (1914), qui ont signalé la présence de Bacilles capsulés dans de nombreux échantillons d'encre de Chine et, chose plus grave (je doute cependant qu'il en ait été ainsi), d'après ces auteurs, GOZONY (1913) aurait expérimenté avec des échantillons d'encre de Chine contaminée et renfermant du Bacille capsulé. Il s'agit là d'une erreur grossière difficile à admettre; cependant HADLEY, BRYANT et ELKINS affirment que l'examen des figures publiées par GOZONY ne laissent aucun doute à ce sujet. Il faut signaler en outre, une cause d'erreur due aux phénomènes de diffraction (1) (cercles et bandes de diffraction). Certes l'encre de Chine permet de percevoir facilement la capsule, mais, même avec les germes qui ne sont pas capsulés et avec des particules inorganisées (il suffit qu'elles jouent le rôle d'écran) on peut percevoir soit des bandes, soit des auréoles brillantes.

Si, pour la majorité des auteurs, il y a identité entre la capsule qui apparaît dans l'organisme et celle qui se manifeste dans un milieu de culture albumineux, FURST (1910) et TOENNIESSEN (1912) distinguent la « capsule animalisée » et la « capsule de culture ». Tandis que la chaleur et le sublimé (fixation) feraient disparaître la seconde, la première ne serait pas modifiée par ces fixateurs. Ce qui s'expliquerait par le fait que la capsule de culture devrait être considérée comme un enrobage de la plastide par la substance albuminoïde.

BIBLIOGRAPHIE

- BONI (J.). — *Centralbl. f. Bakt., Orig.*, Bd. XXVIII, p. 705, 1900, *Giorn. Soc. ital. igiene*, Milano, 23, p. 417-430, 1901.
BUERGER (L.). — *Proceed. of the N. Y. path. Soc.*, T. IV, 1904; *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Bd. 39, Orig., p. 216-224; 335-352, 1905.

(1) On sait que les cercles de diffraction atteignent une importance considérable dans l'examen ultramicroscopique.

- CARPANO (M.). — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Orig., Bd. 70, p. 42-50, 1913;
Ann. Ig. speriment., T. XXIII, f. 2, p. 149-160, 1913, ref. *Bull. Inst. Past.*,
T. XII, p. 55, 1914.
- CIANI (H.). — *Ann. d. Staz. per le mal. infet. d. Bestiame*, Naples, T. I,
p. 245-263, 1911-1913.
- EISENBERG. — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Bd. 47, Orig., p. 415-427, 1908.
- ERRERA (L.). — *Recueil Inst. Bot. Univ.*, Bruxelles, T. II, p. 103-106, 1906.
- FURST (Th.). — *Centralbl. f. Bakt.*, abt. I, Bd. 56, Orig., p. 97-110, 1910.
- GAMALEIA. — *Wratsch*, n^{os} 19 et 20, 1894, ref. *Ann. de Micrographie*, T. VII,
p. 174, 1895.
- GOTTHEIL (O.). — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. II, Bd. VII, p. 430-449, 1901.
- GOZONY LAJOS. — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Bd. 68, Orig., p. 594-597, 1913.
- GRIMME. — *Inaug. Dissert.*, Marburg, p. 56, 1902; *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I,
Bd. 32, 1902; *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Orig., Bd. 36, p. 352, 1904.
- HADLEY (P.), BRYANT (R.), ELKINS (M.). — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I,
Bd. 72, Orig., p. 478-480, 1914.
- HAMM (A.). — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Orig., Bd. 43, p. 287-303, 1907.
- HARDOUIN (J.). — *C. R. Soc. Biol.*, T. 72, p. 298-299, 1912.
- HINTERBERGER (A.). — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Bd. 30, p. 417-424, 1901.
- KOPACZEWSKI (W.). — *Protoplasma*, T. XIV, n^o 2, p. 283, 1931.
- KODAMA (H.). — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Orig., Bd. 62, p. 177-180, 1912;
Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Orig., Bd. 68, p. 373-428, 1913.
- KUHNEMANN (G.). — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Orig., Bd. 57, p. 497-499,
1911.
- LASSEUR (Ph.). — *Thèse Sciences*, Nancy, p. 19-33, 1911.
- MARASSINI (A.). — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Orig., Bd. 71, p. 113-126,
1913.
- MEYER (A.). — *Die Zelle der Bakterien*, Fischer, Jena, p. 141, 1912.
- PREISZ (H.). — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Orig., Bd. 44, p. 209-210, 1907.
- ROSENOW (E.-C.). — *Journ. of infect. dis.*, Chicago, T. IX, p. 18, 1911, ref.
Bull. Inst. Past., p. 935, 1912.
- ROTKY (K.). — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Orig., Bd. 74, p. 285-294, 1914.
- SEGRE (S.). — *Boll. della Sez. Ital.*, A. IX, fasc. IX, vol. III, p. 569-570,
1931.
- SMIT (J.). — *Folia Microbiol.*, T. V, f. I, p. 1-9, 1917.
- SOBERNHEIM (G.). — *Handbuch d. path. Mikroorg.*, Kolle et Wass., III^e vol.,
2^e édit., p. 589, 590, 591, 1913.
- TOENNIESSEN (E.). — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Orig., Bd. 65, p. 23-25,
1912; *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Orig., Bd. 85, p. 225, 1920.
- VERLENDE (J.). — *Revue Belge des Sciences Médicales*, T. IV, n^o 7, 7 pages,
1932.
- VUILLEMIN (P.). — *Ann. Mycologici*, vol. XI, n^o 6, 1913.
- ZETTNOW. — *Centralbl. f. Bakt.*, Bd. X, p. 689, 1891; *Zeitschr. f. Hyg.*, Bd.
XXIV, p. 72, 1897; *Zeitschr. f. Hyg.*, Bd. 85, p. 17-32, 1918.

CYTOPLASME.

Vacuole.

Si en 1885 ZOPF a parlé de vacuole, il l'a fait d'une façon tout à fait générale, en envisageant les Schizophytes et c'est à MIGULA (1894) que nous devons la première description de la vacuole chez les Bactéries.

Je ne reviendrai pas sur l'histoire de ces formations, puisque j'ai déjà eu l'occasion de traiter ce sujet dans le Bulletin de l'Association des Diplômés de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy, n° 5, p. 9-II, 1932.

BIBLIOGRAPHIE

- BEAUVERIE (J.). — *Revue de Pathol. végét.*, T. XIII, 1926 (tirage à part); *C. R. Acad. Sc.*, T. 182, p. 1343, 1926; *C. R. Soc. biol.*, T. XCVIII, p. 309, 1928.
- BREDEMANN (G.). — *Dissertation*, Marburg, p. 57, 1908.
- DUFRENOY (J.). — *C. R. Soc. biol.*, T. CVIII, p. 617-618, 1931.
- FISCHER (A.). — *Ber. d. Kgl. Gesellsch. d. Wissensch. mathem. physic. Klasse*, p. 104, 1891.
- GUILLIERMOND (A.). — *Archiv f. Protistenkunde*, Bd. XII, p. 9-43, 1908; *Volume jubilaire V. Grégoire*, 2^e partie « La Cellule », vol. XXXVI, p. 217-229, 1924; *Bull. d'histologie appliquée*, t. II, 1925 (tirage à part); *Czechoslovak Eugenics Society in Prague*, p. 146-160, 1925; *C. R. Acad. Sc.*, T. 180, p. 951, 1925; *C. R. Soc. biol.*, T. C, p. 1180-1185, 1929; *Protoplasma*, T. IX, n° 1, p. 133-174, 1930; *C. R. Soc. biol.*, T. CIV, p. 468-472, 1930; Extrait de la *Revue générale de Botanique*, T. 42, 1930.
- LASSEUR (Ph.). — *Thèse Sciences naturelles*, Nancy, Berger-Levrault, p. 27, 1911.
- LASSEUR (Ph.) et VERNIER (P.). — *Bull. Soc. Sc. Nancy*, série IV, T. II, fasc. II, p. 73-131, 1924.
- MANGENOT (G.). — *Données morphologiques sur la matière vivante*; Guillon, Paris, 1930, 258 pages.
- MIGULA (W.). — *Arb. a. d. Bakt. Inst. d. techn. Hochschule Karlsruhe*, Bd. 1, p. 139, 1894; *System der Bakterien*; t. I, Fischer, Jena, p. 86, 1897.
- PÉNAU (H.). — *Thèse sciences nat.*, Paris, 1912; *Revue génér. de Bot.*, T. XXIV, p. 13, 68, 113, 149, 1912.
- SCHAUDINN (F.). — *Arch. f. Protistenkunde*, Bd. I, p. 306, 1902.
- ZOPF. — *Die Bakterien*, Breslau, III, Aufl. 1885.

Noyau.

Le noyau des Bactéries a suscité un nombre considérable de recherches qui ont conduit à des conclusions bien discordantes. Je résume sous forme de tableau les différentes opinions émises à ce sujet.

TABLEAU II.

I. Les Bactéries ne possèdent pas de noyau :

FISCHER (1895-1897).

MIGULA (1897).

MASSART (1902).

ALEXEIEFF (1923).

II. Les Bactéries possèdent un noyau :

On a considéré comme noyau :

1° Toute la cellule	RUZICKA (1904).
2° Le Protoplasme (corps central)	WAHRlich (1890). BUTSCHLI (1890).
3° La membrane	TRAMBUSTI et GALEOTTI (1892).
4° Les vacuoles	SCHOTTELIUS (1888) — ERNST (1889). NAKANISHI (1901).
5° Les grains métachro- matiques.	MENCL (1904).
6° Un organite à con- tour défini.	noyau type (ou vésiculeux) A. MEYER (1911). MESNIL-DOBELL (1911). Ch. HOLLANDE et G. HOLLANDE (1931). SCHUSSNIG (1921).
7° Le système chromidial	noyau diffus MESNIL (1905). SWELLENGREBEL (1906). GUILLIERMOND (1908). SCHUSSNIG (1921).

K. PIETSCHMANN (1931), K. PIETSCHMANN et A. RIPPEL (1932) ont consacré deux mémoires importants à l'étude de la réaction de FEULGEN, chez différentes Bactéries. Il résulte de ces recherches qu'il « *n'existe pas de noyau morphologiquement définissable chez les Bactéries* » (p. 449).

Je m'excuse de ne pouvoir citer tous les auteurs qui se sont intéressés à

l'étude du noyau. La longue énumération des recherches effectuées dépasserait le cadre de ce travail. L'étude critique de la bibliographie relative à la présence du noyau chez les Bactéries constituerait à elle seule l'objet d'une thèse qui ne serait pas une des moins intéressantes de la Microbiologie.

Ce rapide exposé historique (et combien incomplet) montre combien la question du noyau chez les Bactéries est compliquée. Il faut donc s'attendre à de nombreuses erreurs d'interprétation.

BIBLIOGRAPHIE

- ALEXEIEFF (A.). — *C. R. Soc. biol.*, T. LXXXIX, p. 728, 1923.
AMBROZ. — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Bd. 51, p. 193, 1909.
ARISTIDES MARQUES DA CUNHA et JULIO MURIEZ. — *C. R. Soc. biol.*, T. C, p. 951-954, 1929.
BUTSCHLI. — *Archiv. f. Protistenkunde*, Bd. 1, p. 41-58, 1902.
DOBELL. — *Bull. Inst. Past.*, T. IX, p. 581, 1911.
DUCLAUX (E.). — *Ann. Inst. Past.*, T. X, p. 729-739, 1896.
ELLIS. — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Orig. Bd. 33, p. 1, 1902.
FUHRMANN (F.). — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. II, Bd. 25, p. 129-159, 1910.
GOTSCHLICH (E.). — *Handbuch der path. Mikroorganismen*, T. I, 1, p. 64, 1929.
HOLLANDE (A.-Ch.) et CRÉMIEUX (G.). — *C. R. Soc. biol.*, T. XCVIII, p. 1379-1381, 1928; *C. R. Soc. biol.*, T. XCVIII, p. 1529-1530, 1928.
HOLLANDE (A.-Ch.) et HOLLANDE (G.). — *C. R. Soc. biol.*, T. CVII, p. 205-207, 1931.
HOLLANDE (A.-Ch.) et FAVRE (G.). — *C. R. Soc. biol.*, T. CVII, p. 752-754, 1931.
HOLLANDE (A.-Ch.) et HOLLANDE (G.). — *C. R. Acad. Sc.*, T. 192, p. 1585, 1931; *C. R. Soc. biol.*, T. CVIII, p. 731-733, 1931; *Archives de Zoologie expérimentale et générale*, T. 72, p. 445-575 (Protistologica, XXXII), 1932.
KUNSTLER (J.) et GINESTE (Ch.). — *C. R. de l'Association des Anatomistes*, 6^e session, Toulouse, p. 3, 1904.
MENCL (E.). — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. II, Bd. XV, p. 544-564, 1906.
MESNIL (F.). — *Bull. Inst. Past.*, T. III, p. 313-322, 1905.
MEYER (A.). — *Die Zelle der Bakterien*; Fischer, Jena, p. 40, 1912.
NAKANISHI (K.). — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Bd. XXX, p. 97-110, 145-158, 225-231, 1901.
PETIT (A.). — *C. R. Soc. biol.*, T. XCI, p. 522-524, 1924.
PIETSCHMANN (K.). — *Archiv f. Mikrob.*, Bd. 2, Heft 2, p. 310-332, 1931.
PIETSCHMANN (K.) et RIPPEL (A.). — *Archiv. f. Mikrob.*, Bd. 3, Heft, 3, p. 422-452, 1932.
PREISZ. — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Bd. XXXV, p. 280, 416, 537, 657, 1904.
RUZICKA (V.). — *Archiv. f. Hyg.*, Bd. 51, p. 281-318, 1904.
SCHAUDINN (F.). — *Archiv. f. Protistenkunde*, Bd. II, p. 421-444, 1903.

- SCHUSSNIG (B.). — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Orig., Bd. 85, Heft. 1, p. 1-12, 1921.
- SWELLENGREBEL (N.-H.). — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. II, Bd. XVI, p. 617-629, 673-681, 1906; *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. II, Bd. XIX, p. 193-201, 1907; *Ann. Inst. Past.*, T. XXI, p. 448-465, 562-582, 1907.
- THOMAS (A.). — *C. R. Soc. biol.*, T. CV, p. 859-861, 1930.
- TRAMBUSTI et GALEOTTI. — *Centralbl. f. Bakt.*, Bd. XI, p. 717-722, 1892.
- VAY (F.). — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Orig. Bd. 55, Heft 3, p. 193-208, 1910.

STRUCTURE DES PLASTIDES DE *B. CARYOCYANEUS*

MEMBRANE.

L'étude morphologique de *B. caryocyaneus* décèle la présence d'une membrane dans de nombreuses conditions d'observation. Tout d'abord, il est à noter que le pigment sécrété par *B. caryocyaneus* peut réaliser une coloration très délicate de la plastide. En effet, une culture de 17 jours sur milieu synthétique L₁ montre des plastides dont la membrane se détache admirablement bien. Ces conditions d'examen sont non seulement très favorables à l'étude de la membrane, mais elles mettent en outre, en évidence l'aspect vacuolaire des plastides.

Lorsqu'on ajoute une goutte de solution de Lugol à une goutte de suspension, on constate que les plastides de *B. caryocyaneus* montrent une zone périphérique jaunâtre, étroite qui correspond à la membrane vue sur le frais. Cette méthode de coloration met très bien en évidence les cloisons transversales des plastides, même lorsque ces cloisons sont réduites à l'épaisseur d'une ligne. Mais le mode d'observation le plus probant, quant à l'existence de la membrane, est l'examen sur fond noir. L'équipage de quartz (condensateur cardoïde et cuves en quartz) avec immersion spéciale n° 58 à la glycérine (angle d'ouverture 0,85) de ZEISS, permettent de réaliser un champ parfaitement noir où la membrane des éléments microbiens se détache sous la forme d'une ligne brillante très réfringente. On peut ainsi observer un très léger étranglement chez certaines plastides sur le point de se diviser. On perçoit avec une grande netteté les cloisons transversales des éléments bactériens réunis en filaments.

On ne saurait donc contester l'existence de la membrane chez *B. caryocyaneus*. Il ne faudrait pas en déduire qu'il est possible d'assigner une composition déterminée à la membrane des Bactéries. Il est même vraisemblable, qu'elle n'est pas la même chez tous les germes que l'on réunit aujourd'hui sous le nom de Bactéries.

Une distinction entre la couche de cytoplasme adhérente à la membrane et le cytoplasme central n'est peut-être pas très justifiée, du moins dans l'état actuel de la science.

RECHERCHE DE LA CAPSULE CHEZ *B. caryocyaneus*

I. — *Examen sur le frais sans coloration.*

Lorsqu'on examine entre lame et lamelle une culture de *B. caryocyaneus*, on constate que les plastides légèrement verdâtres sont entourées d'une auréole brillante blanche. Cette zone brillante correspond-elle à une formation ou est-elle la conséquence d'un phénomène de diffraction ?

Il faut remarquer que si on observe cette auréole avec les éléments de toutes les cultures, son importance varie avec les milieux considérés. Elle est en général très accentuée chez les plastides provenant de cultures effectuées sur gélose, sur milieu albumineux, sur milieu phéniqué et sur milieu lithiné.

L'auréole devient plus facilement perceptible lorsqu'on effectue l'examen entre lame et lamelle en présence d'une trace de colorant en solution aqueuse (coloration vitale).

II. — *Examen après coloration vitale.*

1° Rouge neutre.

Une culture de 18 heures sur gélose peptone (pH = 7) émulsionnée dans une solution aqueuse de Rouge neutre très diluée montre après une demi-heure de contact entre les plastides et le colorant, des éléments dont le cytoplasme faiblement teinté présente çà et là des grains rouge-brun. Tout autour de la plastide, on observe une zone blanche, qu'il s'agisse de plastides isolées, de diplobacilles ou de filaments. Dans le cas des diplobacilles, les deux plastides légèrement colorées sont séparées par un espace non coloré d'importance variable. La gaine hyaline entourant les plastides se perçoit admirablement bien lorsqu'on a affaire à des filaments, elle est moins visible dans les éléments isolés. Cette observation est conforme aux faits rapportés par A. MEYER dans son étude sur *B. asterosporus*.

Nous venons de voir que le Rouge neutre met nettement en évidence la capsule qui entoure les plastides de *B. caryocyaneus*. D'autres colorants permettent d'arriver au même but et en premier lieu je citerai le Rouge de Magdala.

2° Rouge de Magdala.

Lorsque la concentration du colorant est suffisamment faible pour que la vitesse de coloration des plastides (1) soit très lente, on constate, après 30 minutes, par exemple, que le cytoplasme et la membrane sont colorés en rouge, tandis que la capsule est légèrement rosée. Là encore, la capsule est particulièrement bien visible chez les filaments, ce qui s'explique fort bien, car il est de toute évidence que la présence d'une gaine constitue un certain obstacle à la dissociation des éléments bactériens et ces derniers restent plus facilement en colonies élémentaires.

Cette méthode de coloration montre aussi la présence d'un pont de cytoplasme (plasmodème) reliant les deux éléments d'un diplobacille.

La recherche de la capsule après coloration vitale donnant des résultats satisfaisants, on pouvait espérer mettre en évidence la gaine entourant les plastides de *B. caryocyaneus* en cultivant cette Bactérie sur eau peptonée additionnée de doses croissantes de matières colorantes.

III. Examen de plastides cultivées sur milieux colorés.

Dans les cultures âgées de 48 heures effectuées en eau peptonée additionnée d'Erythrosine à la dilution de 1/60, le nombre des plastides colorés est relativement faible, il est inférieur à 25 %. Si les autres éléments ne sont pas sensiblement colorés, ils se perçoivent néanmoins avec beaucoup plus de netteté que les Bactéries examinées dans l'eau. Tout autour de la plastide, qu'il s'agisse d'éléments isolés, de diplobacilles ou de filaments, on constate l'existence d'une gaine qui paraît très légèrement rosée, la présence de cette gaine ne fait aucun doute, car elle a été nettement perçue par toutes les personnes à qui j'ai montré les préparations.

En résumé, sur le frais, avec ou sans coloration, la limite de la capsule est parfaitement nette.

Les colorations vitales permettent de déceler la présence d'une capsule chez *B. caryocyaneus*, voyons si cette formation peut être aussi facilement mise en évidence sur les préparations fixées.

IV. Examen de préparations fixées.

Les plastides provenant de milieu non albumineux, fixées par la chaleur et colorées par les colorants usuels, ne montrent, à l'examen microscopi-

(1) Bactéries provenant du voile d'une culture, âgée de 4 jours, effectuée sur milieu synthétique L₁.

que, d'autre aspect que la zone brillante qui entoure habituellement les particules, lorsqu'on diminue le cône lumineux en fermant très légèrement le diaphragme iris. Cette image correspond vraisemblablement à ce que les bactériologistes désignent sous le nom d'auréole claire et qu'il serait plus prudent de comparer aux cercles brillants de diffraction.

Pour la majorité des auteurs, la partie mucilagineuse qui entoure la plastide se contracte sous l'action de la chaleur, il n'y a donc rien d'étonnant à ce que l'examen microscopique de préparations desséchées et fixées par la chaleur ne décèle plus de capsule chez *B. caryocyaneus* (1).

J'ai essayé de mettre en évidence la capsule par la méthode à l'encre de Chine proposée par ERRERA (1884), et entrée dans la technique microbiologique à la suite des travaux de BURRI (1909).

Dans ces essais, j'ai suivi la technique indiquée par LASSEUR. Dans aucun cas, l'encre de Chine ne m'a permis d'obtenir des résultats supérieurs à ceux que j'ai mentionnés ci-dessus. Elle ne montre pas autour de la plastide de *B. caryocyaneus* une bande plus large et mieux définie que celle que l'on voit à l'examen microscopique ordinaire.

J'ai enfin essayé de colorer la capsule de *B. caryocyaneus* sur les préparations fixées en suivant le mode opératoire ci-dessous :

- a) les corps microbiens sont mis en suspension dans l'eau physiologique.
 - b) sur une lame porte-objet, on dépose une goutte de solution albumineuse (2) à laquelle on ajoute une goutte de suspension microbienne.
 - c) on mélange, puis on étale le liquide sur une surface d'environ 30 x 20 millimètres.
 - d) avant que la préparation soit desséchée, on fixe en renversant la préparation dans un fixateur convenable.
- Les fixateurs utilisés ont été les suivants : liquide de ZENCKER, liquide de LENHOSSEK, liquide de BOUIN ; liquide de DUBOSCQ et BRAZIL, liquide de HOLLANDE. Le fixateur employé ne doit pas déterminer un coagulum à mailles lâches. On doit obtenir un fond uniforme dans lequel les plastides paraissent implantées.
- e) on lave à l'eau ou aux alcools de titre décroissant suivant le fixateur utilisé.
 - f) on mordance.

(1) Les préparations desséchées montrent des plastides à structure vacuolaire renfermant des grains polaires très brillants. Il est à noter que ces détails de structure ne s'observent que dans des préparations offrant une richesse convenable en encre de Chine.

(2) La solution albumineuse utilisée était du sérum de Lapin.

Les mordants employés sont les mêmes que ceux que nous avons utilisés antérieurement dans la coloration des fouets (1) des Bactéries (Ph. LASSEUR, P. VERNIER, A. DUPAIX et S. ZAHL, 1930). Dans certains cas c'est une matière colorante qui a joué le rôle de mordant.

g) on lave.

h) on colore. La coloration peut être effectuée suivant plusieurs schémas. J'indique ci-dessous quelques-uns de ces schémas :

COLORATIONS SIMPLES

Schéma I : Colorer par le Ziehl à chaud,
Laver à l'eau.
Sécher. Huile de cèdre.

Schéma II : Colorer par le Ziehl à chaud,
Mordancer,
Colorer par le Ziehl à chaud,
Laver à l'eau...

COLORATIONS DOUBLES

Schéma III : Colorer par le Ziehl à chaud,
Laver à l'eau.
Colorer par la Pyoctanine à chaud,
Laver à l'eau...

Schéma IV : Colorer par le Ziehl à chaud,
Laver à l'eau,
Colorer par le Bleu de méthylène à chaud,
Laver à l'eau...

Schéma V : Colorer par le Ziehl à chaud,
Décolorer par l'alcool,
Colorer par la Pyoctanine,
Laver à l'eau...

Schéma VI : Colorer par le Ziehl à chaud,
Mordancer,
Laver à l'eau,
Colorer par le Ziehl à chaud,
Laver à l'eau,
Colorer par la Pyoctanine,
Laver à l'eau...

(1) Travaux du Laboratoire, fasc. III, p 81 et suivantes, 1930

COLORATIONS TRIPLES

Schéma VII : Colorer par le Ziehl à chaud,
Laver à l'eau,
Colorer par le Bleu de méthylène,
Laver à l'eau,
Colorer par la Pyoctanine,
Laver à l'eau...

Schéma VIII : Colorer par le Ziehl à chaud,
Mordancer,
Colorer par le Bleu de méthylène,
Mordancer,
Colorer par la Pyoctanine,
Laver à l'eau...

Schéma IX : Colorer par le Ziehl à chaud,
Laver à l'eau,
Colorer par le Violet de gentiane,
Laver à l'eau,
Colorer par le Bleu de méthylène,
Laver à l'eau...
etc....

L'emploi de ces différentes colorations conduit aux résultats suivants : dans certains cas (schéma III) la plastide est colorée en bleu foncé et la capsule est bleu clair ; dans d'autres cas (schéma V) la plastide rouge très foncé est entourée d'une auréole rose. On peut observer (schéma VI) des plastides violet foncé dont la capsule est légèrement teintée en bleu, enfin après coloration par le schéma VIII les plastides sont violet noir tandis que la capsule est violet bleu très clair.

Dans certaines préparations, la capsule offre un volume bien supérieur à celui de la couche muqueuse perçue sur le frais. Cet accroissement de volume peut s'expliquer de la façon suivante : la plastide fixe par adsorption une quantité plus ou moins importante d'albumine. La fixation de protéine peut s'accompagner du phénomène de « *dénaturation* » de l'albumine décrit par LOEB. Aussi lorsque les méthodes de coloration augmentent trop le volume de la capsule, y a-t-il lieu d'être très prudent dans l'interprétation des images obtenues et il faut penser aux artifices de préparation toujours possibles. Sous ces réserves l'image observée correspond certainement à la réalité pour toute une série de colorations, ainsi dans le schéma VI où le cytoplasme et la membrane sont colorés en violet assez foncé, certains éléments montrent un étranglement de la plastide vers le milieu, bien que très peu accusé, l'étranglement est indiscutable. Or, toute cette

masse violet foncé est entourée d'une auréole bleu ciel présentant deux légères dépressions au niveau de l'étranglement de la plastide. De ces dépressions, il part, se dirigeant vers la membrane, deux petites pointes triangulaires colorées de façon plus intense. On ne saurait parler d'artifice dans ces préparations. L'obtention de ces images nécessite quelques précautions élémentaires. Il faut évidemment éviter toute surcoloration déterminant un empâtement des éléments bactériens. C'est d'ailleurs l'écueil à redouter dans toutes les colorations de capsule.

L'ensemble des procédés utilisés permet donc de mettre en évidence, et cela d'une façon indiscutable, l'existence d'une capsule entourant les plastides de *B. caryocyaneus*. Certes, il ne faudrait pas toujours attribuer comme dimensions réelles de la capsule celles que l'on peut percevoir dans certaines conditions de coloration. Il s'agit là d'artifices de préparation qui ont augmenté considérablement le volume de la capsule. Il faut donc savoir faire un choix judicieux des méthodes qui permettent la mise en évidence de cette couche externe de la membrane.

Sous ces réserves, les plastides de *B. caryocyaneus* sont entourées d'une capsule dont l'importance varie avec les conditions de culture, mais dont l'existence ne saurait être mise en doute.

CYTOPLASME.

Vacuoles. — Lorsqu'on examine entre lame et lamelle (sans coloration) une culture de *B. caryocyaneus* âgée de 15 à 18 heures, on perçoit la plastide sous la forme d'un bâtonnet ou d'une masse ovale dans laquelle on reconnaît une couche pariétale se détachant nettement (la membrane) et une masse centrale. Cette masse centrale offre des aspects différents qui peuvent se ramener en première approximation aux deux schémas suivants :

- 1) structure alvéolaire;
- 2) structure vacuolaire.

1. *Structure alvéolaire.* — La structure alvéolaire n'est perceptible qu'à la condition de diaphragmer légèrement le microscope. On l'observe surtout comme nous le verrons dans un instant avec les colorants vitaux.

2. *Structure vacuolaire.* — La masse centrale n'est pas homogène, on perçoit en général des plages claires que l'on peut considérer comme des vacuoles. Le contraste entre les parties sombres verdâtres et les parties claires s'accroît considérablement dans les éléments provenant de cultures effectuées en présence de chlorure de lithium et un filament de quelques

plastides donne l'impression d'être crénelé tant les plages sombres et claires s'opposent régulièrement. Chez les plastides prélevées dans des cultures sur milieu usuel (milieu synthétique L₁ et gélose), on constate exceptionnellement une vacuole centrale unique. Parfois la vacuole est coupée par un ou deux ponts de cytoplasme constituant ainsi deux ou trois vacuoles disposées suivant le grand axe de la plastide. Le plus souvent, les vacuoles sont distribuées irrégulièrement dans la plastide.

On peut penser tout d'abord à des inclusions de graisse. On sait que les matières grasses brillent d'un vif éclat à l'examen en champ sombre (1) mais si l'examen ultramicroscopique des plastides de *B. caryocyaneus* montre une membrane très réfringente et des grains polaires ou pariétaux également très réfringents, la position de ces points ne correspond pas à l'emplacement des vacuoles. Le reste de la plastide est optiquement vide. De plus, le traitement des plastides par l'acide osmique ou le Soudan III (réactifs des graisses) ne décèle pas de formation grasseuse sur du matériel desséché ou non (provenant de cultures sur milieu synthétique L₁ âgées de 48 heures). De même le traitement des plastides par la solution de Lugol ne donne pas la coloration brune caractéristique du glycogène.

La vacuole peut être terminale, et dans ce cas elle affecte toute la largeur de la plastide, tandis que les grains perçus à l'ultramicroscope n'occupent qu'une fraction du pôle. Le plus souvent, les vacuoles ne sont pas polaires et sont situées à des positions différentes de celles des grains. Enfin, en utilisant des condensateurs permettant de passer du champ sombre au champ clair sans toucher à la préparation, on constate que les grains polaires se colorent d'une façon intense par les colorants vitaux (2) (Rouge neutre, Bleu de méthylène, Bleu de toluidine), alors que les plages claires, que l'on considérerait comme des vacuoles avant l'introduction de tout colorant, restent pratiquement incolores.

On retrouve donc, avec *B. caryocyaneus*, des images absolument semblables à celles que BEAUVERIE (1928) a observées chez *Azotobacter*.

Il eut été évidemment bien plus simple d'étudier le vacuome sur des préparations desséchées et fixées par la chaleur. A. MEYER (1912) a déjà attiré l'attention sur la déformation que la dessiccation fait subir aux vacuoles. Cependant à titre d'indication, j'ai, avec le même matériel bactérien, effectué deux catégories de préparations, les unes desséchées sont colorées

(1) ARTHUR MEYER (1912); GUILLIERMOND (1929-1930).

(2) Pour réaliser ces colorations, on a avantage à utiliser les cuves en quartz, dont le couvre-objet est percé de trous permettant, à l'aide d'un tube capillaire, l'addition de réactif sans démonter la préparation.

par les mélanges de MAY-GRUNWALD et de GIEMSA (méthode panoptique de PAPPENHEIM); les autres sont soumises au traitement suivant :

- 1° fixation par le picroformol des préparations *encore humides*;
- 2° lavage prolongé dans les alcools de titre décroissant;
- 3° lavage prolongé à l'eau. L'excès d'eau est enlevé extrêmement rapidement avec du papier buvard;
- 4° traitement par la solution de MAY-GRUNWALD, qui est additionnée immédiatement de son volume d'eau, puisque les préparations sont déjà fixées;
- 5° coloration par la solution de GIEMSA (1).

Les résultats observés peuvent se résumer ainsi :

Dans le premier cas (préparations desséchées), certaines plastides montrent une masse centrale plus ou moins ovalaire colorée en violet noir, les extrémités étant à peine roses. Chez d'autres plastides, le cytoplasme, contracté, s'est condensé dans une partie de la plastide qui est colorée en violet noir, tandis que le reste de la plastide est rose. Enfin, parfois, les deux pôles sont colorés en violet-noir, toute la partie centrale est au contraire à peine teintée en rose.

Dans le deuxième cas (préparations fixées humides par le picroformol et non desséchées ultérieurement), les plastides colorées par la méthode de GIEMSA montrent une structure sensiblement homogène.

L'importance du fixateur apparaît donc très nettement.

J'ai cherché à faire apparaître des détails de structure chez des plastides âgées de 4 jours cultivées sur milieu synthétique L₁ additionné de chlorure de lithium (2 %) en ayant recours à la décoloration par l'alcool durant 4 à 20 secondes.

La méthode de coloration est la suivante :

- 1) fixer des préparations (non humides, desséchées) par le picroformol;
- 2) passer dans les alcools de titre décroissant;
- 3) laver à l'eau;
- 4) enlever l'excès d'eau avec du papier filtre;
- 5) rapidement, avant que la préparation soit desséchée, recouvrir de MAY-GRUNWALD;
- 6) additionner d'un égal volume d'eau, contact 10 minutes;
- 7) laver avec la solution de GIEMSA;

(1) Le temps d'action du colorant est de 20 à 30 minutes.

- 8) colorer avec la solution récente de GIEMSA 20 à 40 minutes ;
- 9) laver à l'eau ;
- 10) décolorer par l'alcool à 95° durant 4 à 20 secondes ;
- 11) laver ;
- 12) sécher.

Dans les préparations ainsi traitées, on observe alors des plastides allongés et des plastides courtes.

Les éléments allongés, notamment les plastides constituant les filaments, montrent les deux aspects suivants :

a) le cytoplasme est coloré en bleu, il présente un ou plusieurs grains violet-rouge ;

b) la plastide est formée par une succession de bandes violet rouge et de bandes claires, en général deux ou quatre bandes violet-rouge alternant avec trois ou cinq bandes claires. Les bandes foncées paraissent être des ponts de cytoplasme.

La fixation pouvant faire apparaître un état vacuolaire qui n'existe pas en réalité, j'ai surtout eu recours, pour l'examen des vacuoles, aux colorations dites vitales, suivant en cela les indications de l'Ecole allemande et d'ailleurs des botanistes français. Les colorants : Bleu de méthylène, Bleu de toluidine, Rouge neutre, ont été utilisés en solution aqueuse suffisamment diluée pour que, même après 30 minutes de contact des plastides avec la solution colorante, seul un petit nombre de plastides soit coloré d'une façon intense, tous les autres éléments étant très légèrement colorés ou à peine teintés.

Nous allons donc examiner les plastides provenant de cultures âgées de 15 heures (effectuées sur milieu synthétique L₄) et colorées par le Bleu de toluidine, le Bleu de méthylène, le Rouge neutre et la solution de Lugol.

Bleu de toluidine. — L'aspect du cytoplasme varie suivant que l'on considère les plastides allongées ou les plastides ovalaires.

1) chez les plastides allongées, le cytoplasme paraît criblé de petites vacuoles. La partie centrale colorée en bleu est parsemée de petites plages incolores. De telles plastides ne sont pas mortes, car très souvent elles sont animées de mouvements vitaux très intenses et ce n'est que lorsqu'elles s'immobilisent que l'on peut étudier aisément leur structure. Nous retrouvons donc là l'aspect alvéolaire déjà signalé précédemment ;

2) dans les plastides courtes, on observe souvent une coloration bleue

des deux régions polaires. La partie centrale est constituée par deux ou trois plages claires que séparent des ponts de cytoplasme colorés en bleu.

De très rares éléments offrent l'aspect suivant : dans la plastide peu ou pas colorée, on perçoit des grains très colorés en bleu-violet. Ces grains ont un diamètre égal à la largeur de la plastide.

Bleu de méthylène — La coloration réalisée par le Bleu de méthylène est une coloration très délicate qui, à mon avis, respecte le mieux la structure de la plastide vivante.

Rouge neutre. — GUILLIERMOND (1930) a montré que « la coloration au rouge neutre est essentiellement vitale ». Dans l'étude de *B. caryocyaneus*, le Rouge neutre a surtout eu l'avantage de montrer des grains terminaux très colorés et la présence, dans certaines plastides, de vacuoles subpolaires.

Quelques plastides donnent l'impression d'un damier constitué par des plages colorées et des plages incolores, mais le nombre des plages claires paraît plus grand chez les plastides traitées par le Rouge neutre que chez les plastides examinées sans coloration. Le Rouge neutre semble donc avoir déterminé au moins un début de coagulation du cytoplasme.

Solution de Lugol. — A. MEYER et ses élèves attachent une grande importance à la coloration par la solution « *Jodjodkalium* ». Dans mes essais, j'ai traité les plastides de *B. caryocyaneus* en suspension dans l'eau physiologique ou l'eau distillée par de faibles quantités de solution de Lugol. Par ce procédé, on met très nettement en évidence les cloisons transversales des plastides et souvent de nombreuses vacuoles.

Granulations — *Grains*.

B. caryocyaneus ne constitue pas un matériel favorable à l'étude des grains et des granulations, tout au plus peut-on dire qu'il ne s'agit pas de grains de graisse ni de grains de glycogène. De plus, ces formations ne sont généralement pas métachromiques.

MOUVEMENT. — ORGANES DU MOUVEMENT

Généralités.

Au premier abord, rien ne semble plus facile que de décider si une Bactérie est douée ou non de mouvement vital. En réalité, peu d'examens microscopiques comportent autant de causes d'erreur. C'est ainsi que, par exemple, pour la majorité des auteurs, les Bacilles dysentériques sont im-

mobiles, tandis que pour une faible minorité de savants, ces germes seraient doués d'une oscillation analogue à celle de l'aiguille d'une boussole.

Lorsqu'on met des plastides bactériennes en suspension dans de l'eau physiologique, du bouillon ou une solution de peptone, si la couche de liquide est suffisante, différents cas peuvent être envisagés :

1^{er} cas. — Le matériel bactérien est représenté par de très petites plastides de fins Cocci, dont tous les éléments sont isolés. Dans cet exemple, nous constatons que chaque élément bactérien est animé d'un mouvement irrégulier « *parfaitement irrégulier, à angle droit de la verticale et pour la couche moyenne de la préparation* ». (J. PERRIN, 1920). C'est le mouvement brownien ainsi appelé en souvenir du botaniste anglais BROWN, qui l'a découvert le premier en 1827. Le mouvement brownien est la conséquence du mouvement incessant qui agite toutes les molécules d'un fluide et de leur choc sur les particules en suspension. On conçoit que le mouvement brownien soit très important pour de petites particules dispersées, mais qu'il perde de son importance à mesure que croît la dimension des germes microbiens. Pour de grosses particules (les Levures, par exemple), la sédimentation sera presque instantanée.

2^e cas. — Nous venons de voir que les petites plastides de Cocci sont animées de mouvement dans la couche moyenne de la préparation. Faisons des mises au point supérieure et inférieure. Pour une mise au point supérieure, par exemple, nous constatons que lorsque les hasards du mouvement brownien amènent les plastides au contact de la lamelle couvre-objet, les particules y restent fixées.

L'introduction d'une substance capable de tuer les Bactéries ne modifie pas le mouvement brownien. Par contre, le mouvement brownien est atténué ou supprimé si l'apport de substance étrangère augmente la viscosité du liquide de dispersion. L'augmentation de la viscosité du liquide dispersif diminue aussi le mouvement vital, c'est d'ailleurs par apport de gélatine que l'on arrive à ralentir suffisamment le mouvement des touffes de fouets pour permettre de les photographier à l'ultramicroscope (NEUMANN); mais le mouvement vital est supprimé par toute substance capable de tuer la plastide, ce qui n'est pas le cas, avons-nous vu, avec le mouvement brownien.

Ces généralités établies, examinons entre lame et lamelle, en couche liquide suffisamment épaisse, une culture jeune de *B. caryocyaneus*, nous constatons un mouvement qui ne rappelle en aucune façon le mouvement des particules d'un hydrosol métallique vu à l'ultramicroscope. Nous décrirons ce mouvement avec détail, mais, dès à présent, nous dirons qu'à

l'examen on a le sentiment que la Bactérie va dans une direction déterminée et qu'elle n'est pas conduite par des forces étrangères (choc des molécules qui lui ferait parcourir des espaces à la façon de billes qui s'entre-choquent). Ainsi certaines plastides parcourent, suivant un chemin rectiligne, tout un champ microscopique, d'autres fois, brusquement, la plastide tourne, pivote sur elle-même et repart dans un sens opposé. D'autres fois encore, la plastide est au repos, elle est immobile, puis tout à coup un tremblement l'agite et elle part soit rapidement, soit lentement dans une direction donnée. Nous ne retrouvons donc là rien qui puisse rappeler le mouvement brownien. D'ailleurs, toutes les causes qui diminuent la vitalité de la Bactérie atténuent ou font cesser ces déplacements; cependant, comme dans le cas de fines particules, il faut tenir compte de l'action des parois et il n'est pas rare de voir la lamelle porte-objet tapissée de plastides, les uns parfaitement immobiles, les autres fixées par un point ou par une partie assez large du corps bactérien, qui semble accolé au verre, tandis que la partie libre peut encore osciller et décrire des cônes de révolution.

Si j'ai exposé un peu longuement ces particularités du mouvement vital, c'est pour montrer qu'il est difficile d'étudier le mouvement brownien avec des plastides mobiles, comme certains savants l'ont effectué.

On sait qu'il est impossible de mesurer rigoureusement le chemin parcouru par une particule en suspension dans l'eau, cette vitesse moyenne d'agitation étant grossièrement fausse, on s'est contenté de mesurer le segment rectiligne qui joint le point de départ au point d'arrivée de la particule. Ce segment est en général d'autant plus grand que l'agitation est plus vive. Si on examine les schémas publiés dans la littérature relative au mouvement brownien des fines particules, on constate que ces schémas ne rappellent que bien vaguement les figures représentant le déplacement d'une plastide bactérienne animée de mouvement vital. D'ailleurs, les récents travaux de VAN NIEL, METZNER ont montré qu'il est possible de déterminer des mouvements d'excitation chez les Spirilles à l'aide de la lumière (1), par exemple un « *mouvement d'effroi* ».

Historique.

Si le mouvement des Bactéries est connu depuis LEEUWENHOECK, on peut, sans injustice grave, attribuer à EHRENBURG et à COHN les premières découvertes relatives à l'existence des organes moteurs des Bactéries. En

(1) L'excitation se produit en moins d' $1/10^6$ de seconde, dans ce cas, il faut en général $1/4$ de seconde pour faire effectuer le mouvement de retour. Or, la lumière n'est pas capable d'inverser la direction d'une particule colloïdale.

effet, les observations de LEEUWENHOECK manquaient de précision et il est incontestable que COHN (1872-1875) a vu la tresse des fouets des Spirilles, la description qu'il en donne ne laissant aucun doute à ce sujet.

KOCH, en 1877, photographie un matériel desséché non coloré; le cliché montre des fouets que l'œil ne discerne pas. L'auteur indique ensuite une méthode de coloration à l'extrait de bois de campêche et à l'acide chromique. Puis LÖFFLER (1890), VAN ERMINGEN (1893), ZETTNOW (1899), etc, découvrent successivement des méthodes de mise en évidence des fouets. On n'en était plus au temps où VAN TIEGHEM (1879), KURTH (1883), de BARY (1884), HUEPPE (1886) pouvaient aisément nier l'existence des fouets. Cependant, malgré toutes les précautions prises, les artifices de préparation persistent, et ce n'est guère que depuis les examens en champ sombre (ultramicroscope) que l'existence des fouets a été réellement admise par tous les bactériologistes. Les magnifiques micro-photographies obtenues par NEUMANN (1925) ne laissent aucun doute sur la réalité des fouets.

Recherches personnelles

TECHNIQUE

Pour pouvoir mettre les fouets des Bactéries en évidence, il est utile de s'adresser à des cultures très jeunes effectuées sur gélose riche en eau de condensation. Les lames porte-objet doivent être mouillables et rigoureusement propres, les plastides bactériennes constituant les seuls centres d'attraction. La suspension est déposée sur la lame en une vingtaine de gouttelettes mesurant 3 millimètres environ de diamètre. Suivant le but poursuivi, on laisse sécher les préparations à 37° C, ou on les fixe encore humides à l'aide d'un fixateur convenable (vapeur osmique, fixateur osmo-chromique, liquide de DUBOSQ et BRAZIL...).

Les méthodes à l'argent sont celles qui nous ont donné les meilleurs résultats, quant à la mise en évidence des fouets et à l'étude de leur structure, mais il faut suivre au microscope les progrès de la coloration et cesser l'imprégnation argentique dès que les fouets sont nettement dessinés.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

B. caryocyanus possède un fouet polaire, le plus grand nombre des plastides est muni d'organe de mouvement, le mode de fixation paraît solide, car les fouets détachés sont rares. La longueur du fouet oscille entre 2 μ et 8 μ , il présente de 3 à 5 spires. Certains éléments paraissent

posséder 2 fouets (un à chaque pôle), mais l'examen un peu plus approfondi montre la cloison de division, en réalité on a affaire à 2 plastides. Il est à remarquer que dans ces conditions, les deux plastides ne sont pas toujours d'égale grandeur, l'une est beaucoup plus petite que l'autre et cependant chez les 2 plastides, le fouet a la même dimension. Quelques fouets sont peu ondulés (fouets fixés dans la position de repos ou chez les plastides mortes). Chez les fouets offrant des courbures, la forme spiralee est incontestable puisqu'on ne peut voir l'ensemble du fouet qu'à la condition de faire varier la mise au point, ce qui implique que toutes les parties ne sont pas sur le même plan. Le fouet n'est donc pas simplement sinueux, mais il paraît enroulé autour d'un cylindre dont le diamètre varie de $0\ \mu\ 5$ à $0\ \mu\ 75$. Les méthodes de coloration à l'argent montrent les plastides entourées d'une capsule blanche. Si dans certains cas, on ne voit pas le fouet traverser la capsule, dans la presque totalité des cas le fouet traverse cette capsule sous forme d'une ligne jaunâtre et vient s'insérer sur le corps coloré en jaune brun de l'élément bactérien. Dans les colorations très faibles le fouet présente un aspect granuleux qui tient à l'amorce de la réduction de l'argent.

Par son mode d'insertion et par la façon dont il se colore à l'aide des méthodes argentiques, le fouet paraît une dépendance du cytoplasme et non de la membrane.

On observe rarement des fouets bouclés. Quant aux touffes signalées chez certaines Bactéries, je ne les ai jamais rencontrées dans les nombreuses préparations de *B. caryocyaneus* examinées.

La largeur des fouets de *B. caryocyaneus* est sensiblement la même que celle des fouets de *B. Le Monnieri* et semble plus grande que celle des fouets de *B. pyocyaneus*. Le fouet de *B. caryocyaneus* paraît légèrement élargi au point où il quitte la capsule. Mais il ne faut pas oublier que l'épaisseur du fouet dépend non seulement du mordantage (MIGULA, 1897), mais aussi de la quantité de substance colorante fixée.

Un examen même très rapide des planches IV, V et VI montre que *B. caryocyaneus* se différencie nettement de *B. fluorescens aureus*, *B. cyaneofluorescens*, *B. chlororaphis* et du Bacille fluorescent pathogène pour les plantes.

B. caryocyaneus, *B. cyanogenes*, *B. pyocyaneus* var. *pyocyanogenes*, le Bacille fluorescent de l'eau « *Hirbquellwasser* » ne possèdent qu'un fouet polaire (Planche III). Chez *B. caryocyaneus*, *B. cyanogenes*, *B. pyocyaneus* var. *pyocyanogenes*, les organes du mouvement ont sensiblement la même forme. Par contre, le Bacille fluorescent de l'eau montre des fouets beau-

Fig. 1. — *B. caryocyaneus* BEIJERINCK-DUPAIX, 1930.

A) Fouet détaché superposé sur la plastide.

Fig. 2. — *B. cyanogenes*.

A) Fouet détaché situé près d'une plastide.

Fig. 3. — *B. pyocyaneus* var. *pyocyanogenes*.

A) Fouets mal fixés, imprégnation argentique trop rapide.

Fig. 4. — Bacille fluorescent de l'eau (HIRBQUELLWASSER).

A) Deux plastides rapprochées montrent un enroulement des fouets.

B) Fouet détaché venant au contact d'un autre fouet et stimulant une ramification.

Figures dessinées à l'aide de la grande chambre claire de ZEISS et avec l'objectif 1,5 de ZEISS (apochromatique) et l'oculaire compensateur K8 (10X) ZEISS.

(10x) Zeiss.
 l'objectif 1,5 de Zeiss (apochromatique) et l'oculaire compensateur K8
 figures dessinées à l'aide de la grande chambre claire de Zeiss et avec

invariant une illumination.

B) Fonget détaché venant au contact d'un autre fonget et si

fongets.

A) Deux plastides rapprochés montrent un enroulement des

Fig. 4. — Bacille fluorescent de l'eau (Hirbquellwasser).

A) Fongets mal fixés, imprégnation argentique trop rapide.

Fig. 3. — B. phocæus var. phocæogenus.

A) Fonget détaché situé près d'une plastide.

Fig. 2. — B. cyanogenus.

A) Fonget détaché superposé sur la plastide.

Fig. 1. — B. cyanogenus Beijerinck-Dubauz, 1930.

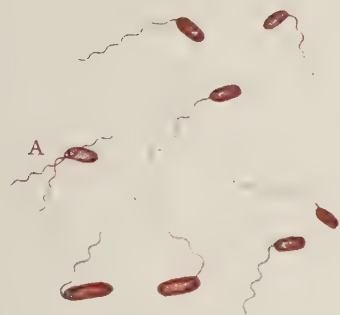


Fig. I

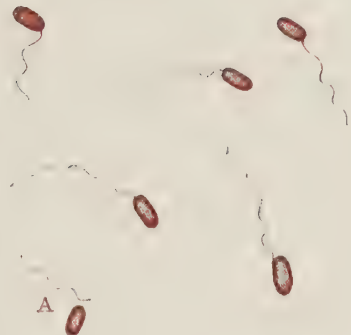


Fig. II



Fig. III

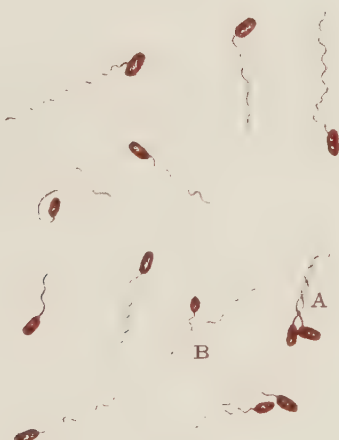
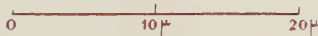


Fig. IV



Lasseur, Vernier, Dupaix, del.

Fig. *a, b, c.* — Plastides munies de 1 à 2 fouets polaires.

Fig. *d, e, f, g.* — Corps microbiens entourés d'une auréole. Chez d'autres espèces bactériennes, cette auréole a été décrite, à tort, comme une capsule.

Fig. *h.* — La pseudo-capsule perd sa symétrie.

Figures dessinées à l'aide de la grande chambre claire de ZEISS et avec l'objectif 1,5 de ZEISS (apochromatique) et l'oculaire compensateur 15 de ZEISS.

Zeiss.

Figures dessinées à l'aide de la grande chambre claire de Zeiss et avec l'objectif 15 de Zeiss (apochromatique) et l'oculaire compensateur 15 de

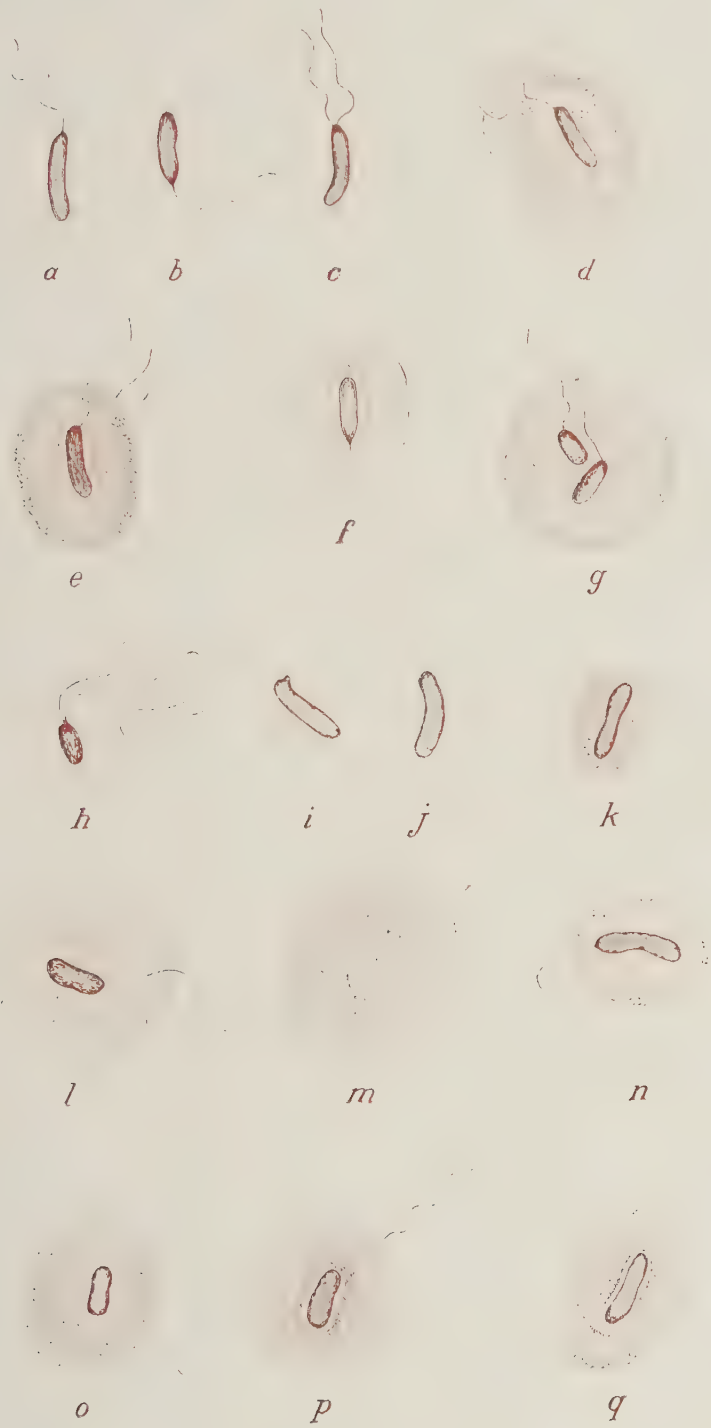
Fig. A. — La pseudo-capsule perd sa symétrie.

capsule.

Fig. d, e, f, A. — Corps microbiens entourés d'une auréole. Chez d'autres espèces bactériennes, cette auréole a été décrite, à tort, comme une

Fig. a, b, c. — Plastides munies de 1 à 2 foyers polaires.

Bacillus cyaneofluorescens Zang



PH. LASSEUR ET P. VERNIER DEL

coup plus longs que ceux des trois premières espèces bactériennes et l'organe moteur peut offrir 8 spires, alors que les fouets de *B. caryocyaneus* ne présentent qu'un nombre de spires variant de 2 à 5.

L'organe moteur ne permet donc pas de différencier sûrement *B. caryocyaneus*, de *B. cyanogenes* et de *B. pyocyaneus*. Fort heureusement, nous possédons d'autres caractères pour identifier chacune de ces Bactéries.

A l'aide de ce fouet, *B. caryocyaneus* se meut très rapidement, son mouvement est intermédiaire entre le mouvement du Vibron cholérique et celui du Bacille typhique. Il ne peut être bien étudié que dans un milieu dont la viscosité est suffisante pour ralentir la vitesse de déplacement, par exemple dans le liquide de peptonisation de l'albumine. On voit alors les plastides se déplacer (1) suivant un mouvement de translation accompagné d'une oscillation autour du grand axe de la plastide. Le mouvement de rotation est aussi très fréquent chez les plastides isolées. D'autres fois la plastide se fixe par un pôle tandis que l'autre extrémité décrit un cône de révolution. La plastide peut être immobilisée pendant un certain temps, puis tout à coup elle est animée d'un frémissement et reprend son mouvement rapide dans le liquide de dispersion. Dans le cas des diplobacilles, la plastide postérieure reliée à la plastide antérieure par un plasmodème paraît « remorquée » par cette dernière. La plastide postérieure peut être animée de tremblement ne se répercutant pas sur la plastide antérieure, ce qui est conforme à ce que l'on sait du rôle des fouets. Si la plastide antérieure se fixe, la plastide postérieure peut décrire des cônes de révolution. D'autres fois la plastide antérieure est agitée violemment, tandis que la plastide postérieure est animée de mouvement de rotation. Très rarement les plastides sont réunies par plus de 2 éléments, mais si on perçoit un filament de 4 éléments, le déplacement s'accompagne d'un mouvement ondulatoire qui donne l'impression d'un système très souple.

BIBLIOGRAPHIE

- COHN (F.). — *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*, bd. I. p. 127-222, 1875.
ELLIS (D.). — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. II, bd. IX, p. 546-561, 1902.
FRACHE (E.). — *Thèse pharmacie*, Nancy, 193 pages, 1926.
FUHRMANN (F.). — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. II, Bd. 25, p. 129-159, 1910.
GOTSCHLICH. — *Handbuch der path. Mikroorg.* I, 1, p. 80, 1929.

(1) Si nous examinons les organes du mouvement chez les microorganismes nous constatons que les êtres unicellulaires peuvent se déplacer soit à l'aide de pseudopodes (Rhizopodes), de flagelles (Flagellés), de cils (Infusoires), soit par des contractions de la membrane élastique (Spirochètes). Chez les Bactéries ou Schizomycètes, l'élément est circonscrit par une membrane rigide, élastique, mais non contractile (VUILLEMIN, 1913), les microorganismes à contractibilité manifeste étant rattachés aux animaux.

- LASSEUR (Ph.) et VERNIER (P.). — *Bull. Soc. Sciences, Nancy*, série IV, T. II, fasc. II, p. 69-135, 1924.
- LASSEUR (Ph.), VERNIER (P.), DUPAIX (A.) et ZAHL (S.). — *Travaux du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie, Nancy*, fasc. III, p. 75-104, 1930.
- MEYER (A.). — *Centralbl. f. Bakt.* I Abt. Bd. 31, orig., p. 737-739, 1902; *Die Zelle der Bakterien*; FISCHER, JENA, p. 105, 1912.
- VAN NIEL (C.-B.). — *Ned. Tijdschr. v. Hyg. Microbiologie en Serologie*, p. 93-112, 1926 (tirage à part).
- NEUMANN (F.). — *Centralbl. f. Bakt.*, I, Abt., Orig., Bd. 96, p. 250, 1925; *Archiv. f. Schiffs und Tropenhygiene*, Bd. 30, p. 125-132, 1926.
- REICHERT (K.). — *Hyg. Rdsch.*, Bd. 17, p. 1121-1125, 1907; *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Orig., Bd. 51, p. 14-94, 1909.
- RORDORF (H.). — *Thèse doctorat Sciences, Lausanne*, 52 pages, 1921.
- VAN TIEGHEM. — *Bull. Soc. bot. France*, T. 26, p. 37-41, 1879.

DIMENSIONS

Généralités. - Historique.

L'étude de la dimension des Bactéries a, comme toutes les questions scientifiques, connu les vicissitudes de la mode. Les premiers bactériologistes pénétrés des disciplines des sciences naturelles, avaient évidemment attaché une certaine importance aux dimensions des germes microscopiques; mais le rôle de ces germes orienta les recherches vers l'étude de la virulence et du pouvoir pathogène. La forme et surtout les dimensions furent quelque peu délaissées. Cette tendance s'accrut encore lorsque la notion de polymorphisme devint à peu près classique. Mais l'idée de cycle, d'évolution des Bactéries ne tarda pas à gagner du terrain. Dès lors, au lieu de considérer une population bactérienne comme formée d'individus très différents, on pensa qu'il s'agissait d'un mélange d'éléments bactériens correspondant à des stades différents de l'évolution d'un microorganisme donné. D'ailleurs dans les sciences naturelles, la biométrie avait suscité des recherches nombreuses et les mathématiciens, les physico-chimistes (E. BOREL, GUYE...) par leur étude des fluctuations, même dans le domaine physico-chimique, donnèrent un regain d'actualité à la détermination des dimensions des Bactéries.

L'école allemande avec GOTTHEIL (1901), GRIMME (1902), Arthur MEYER (1912) s'était préoccupée des causes d'erreur dans la mesure des Bactéries et en France, sous l'impulsion de LASSEUR l'étude de la question est entrée dans une phase toute nouvelle avec les publications de NEPVEUX (1920), de PALGEN (1925), de MINOUX (1926-1927) et de ROLIN (1929).

On sait que les Bactéries peuvent être ramenées à 3 types de formes : cylindrique, sphérique et spiralee. L'examen après coloration montre, pour les Bactéries cylindriques, la projection d'un cylindre, soit un rectangle.

BRACHET (1917) considérait la taille normale comme un état d'équilibre qui ne peut être dépassé sans entraîner des complications inévitables telles que la division des organismes simples. Rapprochant cette conception de la « *taille critique* » (LEWIS, 1909) que l'on observe avec les émulsions et les suspensions, LASSEUR formula l'hypothèse suivante : chez les Bactéries en forme de bâtonnets, il doit exister une relation entre la longueur et la lar-

geur $\frac{L}{l}$ du rectangle ou entre la hauteur et le diamètre du cylindre $\frac{H}{D}$

PALGEN esquisse une tentative dans la direction indiquée par LASSEUR et dans un travail remarquable (1), mon camarade montre comment le

rapport $\frac{L}{l}$ peut passer de 7,1 à 3,53 lorsque *B. mesentericus* est cultivé

en milieu L_1 dont la concentration en sulfate de magnésium croît de 50 mmgr. à 5 gr.. Des faits analogues s'observent avec *B. subtilis*. De même, étudiant les populations de *B. mesentericus niger* du premier au neuvième

jour de culture, PALGEN constate que le rapport $\frac{L}{l}$ passe de 3,83 à 2,55.

Cette question prend aussi une grande importance avec les recherches

d'un autre élève du Laboratoire : M. MINOUX. A l'aide du rapport $\frac{L}{l}$

MINOUX (1926-1927) définit ce que l'on entend par forme normale.

ROLIN (1929) a appliqué une partie de ces données ainsi que celles qui ressortaient de l'admirable conférence que fit M. le Professeur G. DARMOIS (25 janvier 1929) au Laboratoire de Microbiologie (2).

Si ces généralités paraissent longues, elles n'en sont pas moins nécessaires pour expliquer l'intérêt que j'ai attaché à la détermination des dimensions de *B. caryocyaneus*.

Le procédé utilisé pour la mensuration des Bactéries consiste dans l'emploi du micromètre objectif et de la chambre claire. Les mesures ont été réalisées à l'aide de l'échelle graduée transparente, obtenue par photographie

(1) Thèse effectuée au Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy.

(2) « *Etude numérique des faits collectifs, Lois statistiques* ». Conférences du Laboratoire de Microbiologie, fasc. I, 1930.

sur verre du dessin de LANGERON (1913), proposée par LASSEUR et G. PARISOT.

Recherches personnelles

Dans sa conférence, M. le Professeur DARMOIS nous a montré l'intérêt présenté par « *les courbes intégrales de fréquence* », j'ai donc adopté ce mode de représentation pour résumer l'ensemble des recherches effectuées sur les différentes populations de *B. caryocyaneus*. En portant en abscisse la longueur du grand axe L ou la valeur du rapport L/l , et en ordonnée le nombre de germes dont la longueur ou le rapport L/l est égal ou inférieur à cette valeur, on obtient une « *courbe intégrale de fréquence* ».

Les résultats sont schématisés par les courbes suivantes :

- 1) Courbes intégrales de fréquence des longueurs de *B. caryocyaneus* cultivé sur milieu L_1 .
- 2) Courbes intégrales de fréquence des longueurs de *B. caryocyaneus* cultivé sur gélose.
- 3) Courbes intégrales de fréquence du rapport L/l des plastides cultivées sur milieu L_1 .
- 4) Courbes intégrales de fréquence du rapport L/l des plastides cultivées sur gélose.

L'examen de ces différents graphiques m'a permis d'établir le tableau suivant où j'indique les valeurs médianes (1) du rapport L/l des plastides cultivées sur milieu L_1 et sur gélose.

TABLEAU III

Valeur médiane du rapport L/l (rapport de LASSEUR)

AGE DES CULTURES	CULTURES EFFECTUÉES SUR MILIEU L_1	CULTURES EFFECTUÉES SUR GÉLOSE
—	—	—
24 heures	4,15	4,3
48 heures	4,28	4,22
17 jours	5,14	4,9

(1) La valeur médiane est une valeur telle qu'il y ait autant de germes dont la longueur ou le rapport $\frac{L}{l}$ soit inférieur à cette valeur que de germes dont la longueur ou le rapport $\frac{L}{l}$ soit supérieur à cette valeur.

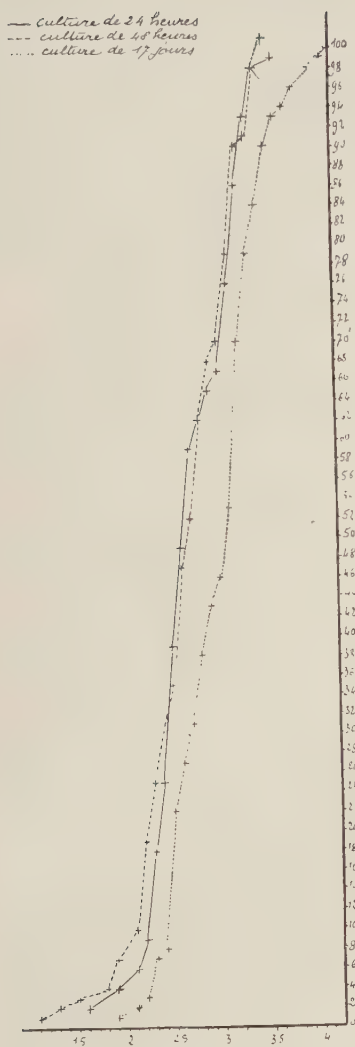


Fig. 1.

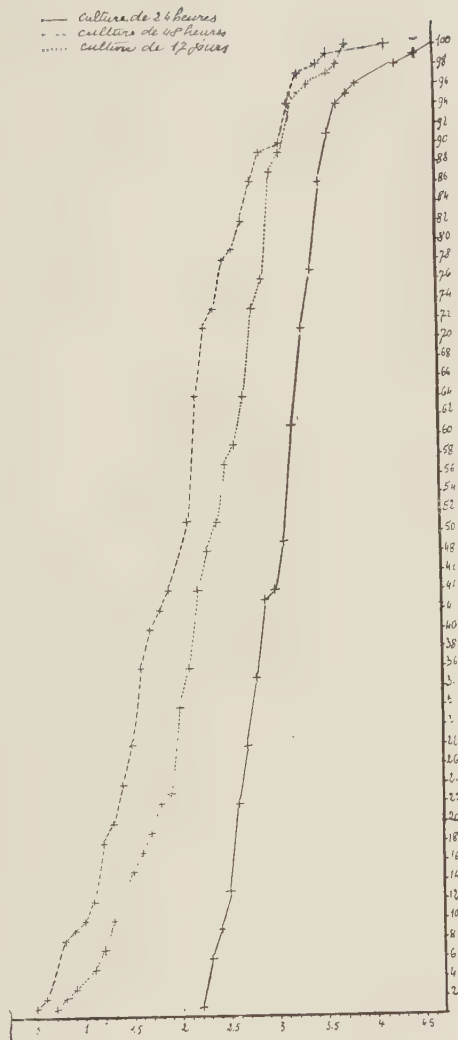


Fig. 2.

Fig. 1

Courbes intégrales de fréquence des longueurs de *B. caryocyaneus* cultivé sur milieu L_1 .

Fig. 2

Courbes intégrales de fréquence des longueurs de *B. caryocyaneus* cultivé sur gélose.

Extrait de « *Variation et Mutation en Bactériologie* » (MARCHAL, 1932).

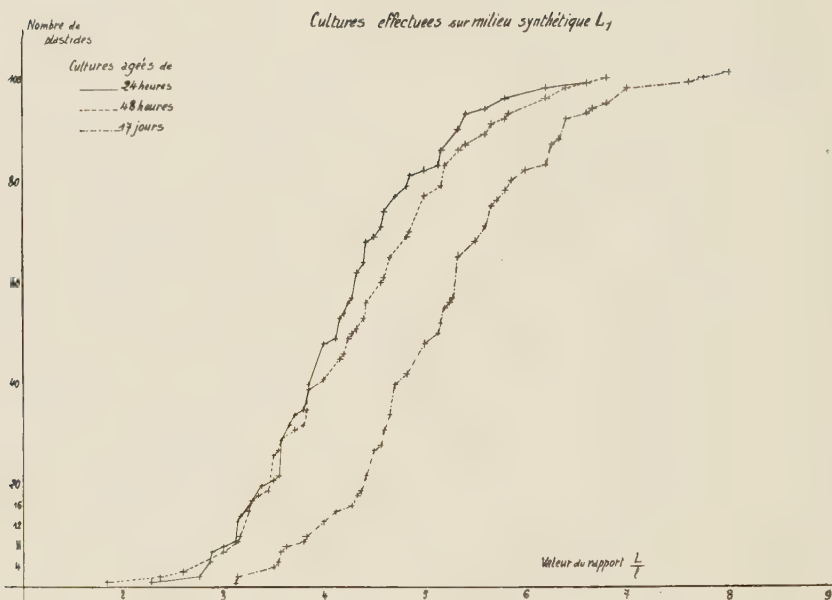


Fig. 3

Courbes intégrales de fréquence du rapport $\frac{L}{l}$ des plastides cultivées sur milieu L_1 .

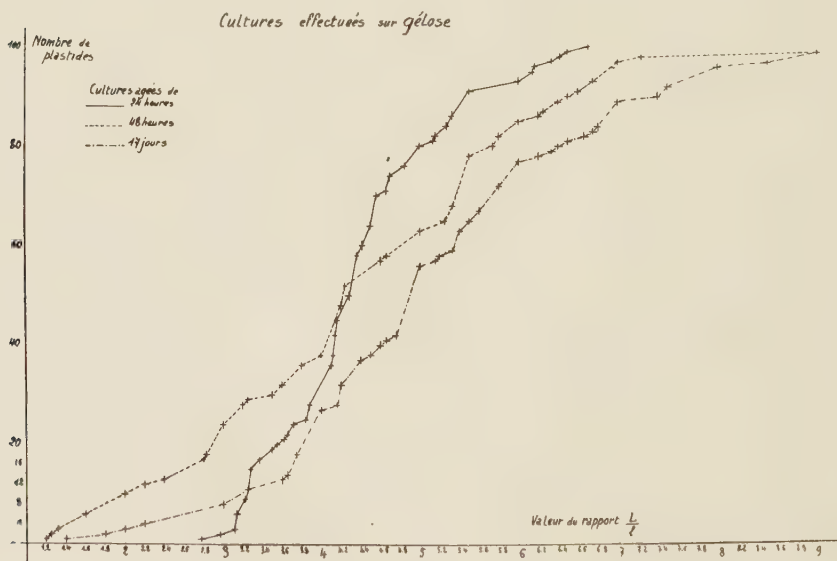


Fig. 4

Courbes intégrales de fréquence du rapport $\frac{L}{l}$ des plastides cultivées sur gélose.

Dans une population bactérienne, on trouve donc un mélange de plastides de tailles très différentes. Cette succession de formes ne doit pas être confondue avec le polymorphisme bactérien. Elle correspond à des stades successifs du « cycle évolutif » (1) décrit par LASSEUR en 1911. Ce cycle peut être schématisé de la façon suivante :

1) Cycle des Bactéries sporogènes. Ex.: *B. mesentericus niger*:

spore → bâtonnet germinatif → sporange → spore.

2) Cycle des Bactéries non sporogènes. Ex.: *B. chlororaphis* :

forme ronde → bâtonnet allongé → bâtonnet court → bâtonnet ovale (condensations polaires) → forme ronde.

Alors qu'avec *B. chlororaphis* on assiste à une succession de formes de plus en plus courtes suivant l'âge de la culture, avec *B. caryocyaneus*, la succession des formes montre des éléments de plus en plus longs (2).

En résumé, *B. caryocyaneus*, offrant une longueur médiane variant de $2\ \mu$ à $3\ \mu$ 2, peut donc être considéré comme une Bactérie de taille moyenne. On sait, en effet, que, d'une part, certains germes peuvent atteindre 50 à 60 μ de longueur sur 4 à 5 μ de largeur (*B. Butschlii* SCHAUDINN) (3), et que, d'autre part, la longueur des plastides peut s'abaisser à 0 μ 5, 0 μ 2 (*Ps. oliveae*). D'après MIGULA, *Pseudomonas indigofera* ne mesurerait que 0 μ 18 sur 0 μ 06. De même, *Micrococcus progrediens* (SCHRÖTTER) n'offrirait que 0 μ 15 (4). De plus, dans son travail sur « Les ultravirus et les formes filtrantes des microbes », HAUDUROY (1929) indique les dimensions de quelques formes filtrantes : *Asterococcus mycoïdes* : 200 $\mu\mu$; *Rickettsiae* : 300 $\mu\mu$; *Chlamydozaires* (corpuscules élémentaires) : 100 à 250 $\mu\mu$; *Bact. pneumosintes* : 150 à 200 $\mu\mu$.

(1) ALMSQUIST (1925) a étudié particulièrement le cycle évolutif des espèces bactériennes. A la lumière des faits observés dans son laboratoire (expériences faites sur les Bactéries du groupe typhique), ce savant est partisan de l'existence de formes filtrantes et de processus sexués chez les Bactéries.

(2) Bien que nous ayons pris les précautions d'usage pour mettre en évidence les cloisons transversales, nous ne pouvons pas affirmer que certaines cloisons ne soient pas passées inaperçues.

(3) Bien que *B. Butschlii* ait été décrit avec de grands détails par SCHAUDINN, certains auteurs font des réserves sur la nature de ce microorganisme.

(4) Il y a lieu d'être prudent dans l'interprétation des dimensions attribuées à *Ps. indigofera* et *Micrococcus progrediens*. On sait, en effet, que dans les conditions habituelles d'observation, la limite de séparation des meilleurs microscopes

est sensiblement égale $\frac{\lambda}{2,8}$ ou $\frac{\lambda}{3}$ soit environ 0 μ 2. Il paraît donc difficile

de parler de dimensions de l'ordre de 0 μ 06 ou même 0 μ 15 pour des mesures faites sur des préparations éclairées par transparence. Evidemment, il n'en serait plus de même en opérant avec l'éclairage oblique.

BIBLIOGRAPHIE

- ALMQUIST (E.). — *Biologische Forschungen über die Bakterien*; Norstedt et Söner, Stokholm, 70 pages, 1925.
- DARMOIS (G.). — *Conférences du Laborat. de Microbiol.*, Faculté Pharmacie de Nancy, fasc. I, p. 11-22, 1930.
- GRIMME. — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Orig. Bd., 36 p. 352, 1904.
- GUIGNARD et CHARRIN. — *C. R. Acad. Sc.*, T. 105, p. 1192-1195, 1887.
- HAUDUROY (P.). — *Les ultravirus et les formes filtrantes des microbes*, Masson, Paris, p. 216, 1929.
- METCHNIKOFF. — *Ann. Inst. Past.*, T. III, p. 61-68, 1889.
- MIGULA (W.). — *System der Bakterien*. Spezielle Systematik der Bakterien; FISCHER JENA, Bd. I, 1897; Bd. II, 1900.
- MINOUX (M.). — *Thèse Pharmacie*, Nancy, 171 pages, 1927; *Considérations générales sur la forme des Bactéries*; Pau' NOGUÉ, Bergerac, 11 pages, 1927.
- NEPVEUX (F.). — *Thèse Pharmacie*, Nancy, 136 pages, 1920.
- PALGEN (W.-B.). — *Thèse Pharmacie*, Nancy, 149 pages, 1925.
- ROLIN (M.). — *Thèse Pharmacie*, Nancy, 159 pages, 1929.
- SCHRÖTTER (J.). — *Kryptogamen flora von Schlesien*, Bd. III, Die Pilze. p. 145, Breslau, 1886.
- WINOGRADSKY (S.). — *Ann. Inst. Pasteur*, T. III, p. 249-264, 1889.

COLORATION PAR LA METHODE DE GRAM

Généralités.

GRAM, 1884 a rendu un service énorme à la bactériologie en montrant que toutes les Bactéries ne se comportent pas de la même façon lorsqu'on les traite successivement par le Violet de gentiane, la solution de Lugol et l'alcool. La subdivision des microorganismes en germes qui se colorent et germes qui se décolorent par la méthode de GRAM a joué un grand rôle dans l'identification des formes bactériennes; mais on s'est aperçu qu'entre ces deux catégories de Bactéries, il existait des formes intermédiaires difficiles à classer dans l'un ou l'autre de ces groupes.

Aussi NEIDE (1904), A. MEYER (1912), d'une part; PALGEN (1925), LASSEUR, et SCHMITT (1927), COUDRAY (1929), BACH et DELETANG (1931), LASSEUR, DUPAIX et MAGUITOT (1931), d'autre part, ont montré qu'à la notion de « prend ou ne prend pas le GRAM », il fallait substituer celle de durée ou mieux celle de vitesse de décoloration. En effet, tous les germes se décolorent par la méthode de GRAM si on fait agir le décolorant un temps suffisant, seule varie la vitesse de décoloration.

C'est pour cette raison que, conformément à la méthode du Laboratoire, j'ai déterminé la vitesse de décoloration des plastides de *B. caryocyanus* après leur traitement successif par une solution colorante de Violet de gentiane ou de Violet cristallisé phéniqué et par une solution de Lugol.

La vitesse de décoloration est sous la dépendance de nombreux facteurs. C'est ainsi que cette vitesse varie avec l'espèce, la race, la souche, l'individu, l'âge de la culture, l'état de nutrition. De même la vitesse de décoloration est aussi influencée par l'épaisseur de la préparation, le mode de fixation et surtout la concentration, la température et le temps d'action de la solution colorante et de la solution iodurée. Il est donc indispensable, lorsqu'on veut déterminer la vitesse de décoloration d'une Bactérie donnée, d'étudier d'abord le pouvoir tinctorial de la solution colorante en fonction d'un germe pris comme test de décoloration.

Parmi les facteurs qui conditionnent la vitesse de décoloration, il faut faire intervenir, en premier lieu, la solution colorante, et c'est bien à cette idée qu'obéissait M. le Professeur ROUX lorsqu'il préconisait l'emploi d'une solution de Violet de gentiane aniliné dans la recherche du Bacille diphtérique. La solution proposée par l'illustre directeur de l'Institut Pasteur présentait déjà de nombreux avantages sur les solutions phéniquées (1), mais ce bain colorant n'était pas d'une très grande stabilité et, en 1927, LASSEUR et SCHMITT ont attiré l'attention sur différentes particularités des solutions colorantes, notamment sur la nature du colorant et les propriétés des solutions.

En collaboration avec Ph. LASSEUR et C. MAGUITOT (1931), j'ai décrit un mode de préparation de solutions colorantes stables de Violet phéniqué.

De nombreux travaux, et en particulier ceux de BOUTARIC, ont montré que les solutions colloïdales avaient une durée définie, souvent très limitée.

(1) Dans un travail fort ancien: *Beitrag zur Theorie der Bacillenfärbung*, EHRLICH (1875), proposait de remplacer l'aniline et les phénols par les aldéhydes. On sait qu'A. MEYER (1912) et ses élèves préconisent fréquemment l'emploi de solutions colorantes formolées, telles que la Fuchsine formolée. C'est vraisemblablement en s'inspirant de ces travaux que BÉGUET (1929) substitue aux solutions colorantes phéniquées, les solutions formolées.

Comme le fait justement remarquer BÉGUET dans son intéressant travail, les solutions formolées ne présentent pas des précipités comme les solutions phéniquées, mais le pouvoir tinctorial des secondes est beaucoup plus grand que celui des premières. Et lorsque l'Ecole allemande propose l'addition de formol aux solutions colorantes aqueuses ou hydroalcooliques, ce n'est pas pour obtenir un bain doué d'un fort pouvoir tinctorial, mais bien une solution jouissant d'une assez grande électivité. Or, dans la méthode de GRAM ce qui nous intéresse ce n'est pas le pouvoir électif de la solution colorante mais bien l'intensité du pouvoir tinctorial.

Or, depuis les recherches de ZSIGMONDY (1901), il est possible d'augmenter la stabilité d'une solution colloïdale à l'égard d'un électrolyte coagulant ou flocculant déterminé. Il suffit, pour cela, d'introduire dans la solution colloïdale hydrophobe une quantité convenable d'un colloïde hydrophile, la gélatine, par exemple. La stabilité du système colloïdal hydrophobe est augmentée, le système est protégé contre l'action précipitante ultérieure d'un électrolyte.

Sur les conseils de M.le Professeur LASSEUR, G. COUDRAY (1929) s'est efforcé d'augmenter la stabilité des solutions de Violet phéniqué par addition de gélatine. Il y avait là un progrès incontestable dans la préparation des solutions colorantes. Cependant, la durée de telles solutions était encore bien limitée, et c'est alors que nous avons pensé à combiner l'action stabilisante observée par ZSIGMONDY à l'action stabilisante décrite par BOUTARIC (1931).

Le savant physicien de Dijon a, en effet, constaté un fait nouveau très curieux : *« la protection qu'exerce l'addition d'un électrolyte en quantité très faible contre la floculation produite par des doses plus fortes du même électrolyte »*.

Lorsqu'on ajoute sans précaution de l'eau phéniquée à 2 ou à 5 % à une solution alcoolique de Cristal violet, on observe le plus souvent une précipitation très rapide de la substance colorante. Cette précipitation peut même devenir pratiquement instantanée par agitation. Les solutions hydro-alcooliques non phéniquées précipitent beaucoup plus lentement que les solutions phéniquées. Le phénol doit donc être considéré comme étant le principal agent précipitant.

Recherches personnelles

TECHNIQUE

PRÉPARATION DES SOLUTIONS COLORANTES. — Ces essais ont porté sur les matières colorantes suivantes : Violet de gentiane et Violet cristallisé des marques R.A.L., Microcolor et Grüber, et Violet de Méthyle 6 B. La matière colorante pulvérisée est dissoute dans l'alcool à 95° dans la proportion de 10 gr. de matière colorante pour un volume total de 100 centimètres cubes. On filtre cette solution alcoolique et on prépare, en outre, une solution d'acide phénique à 5 % et une solution de gélatine à 0 gr. 200 %. La gélatine est dissoute vers 40-50° C. Le sol de gélatine est filtré et employé à cette température.

La solution colorante définitive est ainsi constituée :

Solution alcoolique de colorant à 10 %.....	50 cm ³
Solution de gélatine à 0,2 %.....	200 cm ³
Solution d'acide phénique à 5 %.....	250 cm ³

Le mélange des trois solutions est effectué de la façon suivante : à 50 cm³ de solution alcoolique de colorant à 10 % on ajoute lentement 200 cm³ de solution de gélatine. La solution colorante hydroalcoolique gélatinée ainsi obtenue est mise à 37° C. durant 24 heures. Puis on procède à l'addition de doses croissantes d'acide phénique pour arriver à un volume total de 250 cm³ de solution d'acide phénique à 5 %.

SCHÉMA D'ADDITION DE L'ACIDE PHÉNIQUE

1 ^{er} jour.....	0.05 cm ³ de la solution phéniquée à 5 %	
2 ^{me} jour.....	0.10	—
3 ^{me} jour.....	0.50	—
4 ^{me} jour.....	1. » »	—
5 ^{me} jour.....	5. » »	—
6 ^{me} jour.....	10. » »	—
7 ^{me} jour.....	25. » »	—
8 ^{me} jour.....	50. » »	—
9 ^{me} jour.....	50. » »	—
10 ^{me} jour.....	108.35	—
TOTAL.....	250.00 cm ³	—

Après addition des 250 cm³ d'acide phénique à 5 % les solutions sont abandonnées 4 jours au repos, puis filtrées.

L'addition d'acide phénique nécessite de grands soins, c'est ainsi qu'il faut éviter l'agitation et se conformer rigoureusement au protocole ci-dessus sans chercher à gagner du temps par l'augmentation trop rapide des quantités d'acide phénique ajoutées.

L'instabilité des solutions se traduit par une précipitation plus ou moins abondante du colorant et une diminution corrélative du pouvoir tinctorial.

Le degré de stabilité de ces solutions a été évalué en fonction de leur pouvoir tinctorial.

L'intensité de la coloration des plastides dans la méthode de GRAM est sous la dépendance de nombreux facteurs, tels que la nature de la solution colorante, le temps et la température de coloration, la nature de la plastide utilisée, etc...

Dans ces expériences, le Violet phéniqué a agi pendant 2 minutes et

l'action du Lugol a été de même durée. La décoloration par l'alcool à 95° a été poussée jusqu'à l'apparition de la teinte gris-violet adoptée comme test de décoloration dans les recherches de LASSEUR et SCHMITT (1927) « *teinte voisine, mais plus faible que 503 A du Code des couleurs* ». Lorsque nous avons utilisé une coloration de contraste, nous avons employé une solution aqueuse de Fuchsine à 0,031 gr. par litre (1). Les préparations doivent être agitées régulièrement pendant leur séjour dans les différents bains. Cette précaution est capitale.

Les différentes parties d'une solution colorante donnent avec diverses cultures de *Staphylococcus aureus* âgées de 24 heures des temps de décoloration assez voisins les uns des autres pour que l'on puisse songer à évaluer le pouvoir tinctorial d'une solution de violet phéniqué en fonction du temps de décoloration de *Staphylococcus aureus*. Ce germe offre en effet, une grande constance de colorabilité.

Nous avons été ainsi conduits à réaliser plusieurs séries de solutions.

PREMIERE SERIE — Nous avons stabilisé les solutions colorantes gélatinées par apports répétés de petites doses d'acide phénique.

DEUXIEME SERIE. — Nous avons supprimé la gélatine et réalisé la protection des solutions colorantes uniquement par apports graduels et répétés d'acide phénique.

L'expérience montre que le pourcentage des plastides décolorées reste sensiblement le même que la solution ait été ou non additionnée de gélatine.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

A l'aide des solutions colorantes ainsi stabilisées par la gélatine et des apports répétés d'acide phénique et en tenant compte des causes d'erreur précitées, j'ai déterminé la vitesse de décoloration des plastides de *B. carboxycyanus* d'âges différents comparativement à la vitesse de décoloration des plastides de *Staphylococcus aureus* provenant d'une culture (sur gélose) âgée de 24 heures.

Après 60 minutes d'action du décolorant (alcool à 95°), 95 % des plastides de *Staphylococcus aureus* sont colorées en violet noir et 5 % sont co-

(1) Pour faciliter un étalement convenable des préparations, il est absolument nécessaire d'utiliser des lames rigoureusement propres. On arrive à ce résultat par le lavage au mélange sulfochromique et le passage dans la flamme d'un bec Bunsen. (DEVAUX et LECOMTE DU NOUY). Pour des renseignements plus détaillés voir : P. LASSEUR et SCHMITT : « *Etude de la réaction de Gram* », Annales de l'Institut Pasteur, mai 1927, t. XLI, page 554.

lorées en violet rouge. *B. caryocyaneus* montre 100 % de ses plastides colorées en rouge si le temps d'action du décolorant est de 4 et 5 secondes.

Le tableau ci-dessous indique les résultats obtenus :

TABIEAU IV

AGE DE LA CULTURE DE <i>B. caryocyaneus</i>	TEMPS D'ACTION DU DÉCOLORANT	POURCENTAGE DES PLASTIDES DÉCOLORÉES
24 heures	5"	100
48 heures	5"	100
3 jours	5"	100
5 jours	4"	100
6 jours	4"	100
10 jours	5"	100
14 jours	5"	100

On aurait pu songer à faire agir le décolorant pendant des temps d'action moindres, malheureusement, il y a presque une impossibilité matérielle à faire agir l'alcool à 95° durant des temps rigoureusement déterminés de 1, 2, 3 secondes. Et c'est pour cela que nous avons adopté comme temps de durée minimum, le temps de 5 secondes.

En résumé, *B. caryocyaneus* ne « prend pas le Gram » au sens des bactériologistes et il offre une vitesse de décoloration analogue à celle que présentent les Bactéries du groupe des Bacilles typhiques et paratyphiques.

BIBLIOGRAPHIE

- BACH (D.) et DELETANG (R.). — *C. R. Soc. biol.*, T. CVII, p. 666-668, 1931.
 BÉGUET (M.). — *C. R. Soc. biol.*, T. CI, p. 894-895, 1929.
 BOUTARIC (A.). — *Les colloïdes et l'état colloïdal*; Alcan, Paris, 1931.
 COUDRAY (G.). — *Thèse Pharmacie*, Nancy, 112 pages, 1929.
 DUPAIX (A.) et RENAUX (M.). — *Travaux du Laboratoire de Microbiologie Faculté Pharmacie*, Nancy, fasc. V, p. 137-140, 1932.
 GRAM (C.). — *Fortschr. der Medizin*, Bd. 2, n° 6, p. 185-189, 1884.
 GRIMME (A.). — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Bd XXXII, p. 86-87-88, 1902.
 LASSEUR (Ph.) et SCHMITT. — *Ann. Inst. Past.*, T. XLI, p. 554-576. 1927.
 LASSEUR (Ph.), DUPAIX (A.) et MAGUITOT (C.). — *Travaux du Laboratoire de Microbiologie, Faculté Pharmacie*, Nancy, Fasc. IV, p. 121-132, 1931.
 NEIDE (E.). — *Centralbl. f. Bakt.*, Bd XXXV, 1 Abt., p. 508-521, 1904.
 PALGEN (W.-B.). — *Thèse Pharmacie*, Nancy, 1925.
 UNNA (P.-G.). — *Centralbl. f. Bakt.*, Bd. III, p. 22, 1888.

CHAPITRE II

CARACTÈRES DE CULTURE

L'étude des caractères morphologiques de *B. caryocyaneus* conduit à cette conclusion que, à eux seuls, ils ne définissent pas suffisamment l'espèce; il faut donc compléter la diagnose par l'étude des phénomènes physiologiques. Parmi ceux-ci, il en est un qui a attiré l'attention du premier observateur, c'est la production d'un pigment bleu qui explique en partie le nom spécifique de *caryocyaneus* proposé par BEIJERINCK. J'étudierai tout spécialement cette production de matière chromogène et à cette étude je rattacherai les autres effets que la vie de la Bactérie détermine sur le milieu où elle se développe: trouble, voile, fluorescence, liquéfaction, réaction du milieu, production d'indol, réduction des nitrates, fermentation des sucres etc... Mais auparavant il me paraît utile d'étudier la réaction de *B. caryocyaneus* à l'oxygène et à la température.

Caractères généraux de Culture

ACTION DE LA CHALEUR

ACTION DE LA CHALEUR

DANS LES PHÉNOMÈNES BIOLOGIQUES — GÉNÉRALITÉS

MADSEN et ses collaborateurs (1) ont longuement étudié l'action de la température dans la phagocytose, l'hémolyse, l'agglutination, la précipitation, la destruction de l'alexine, des agglutinines, des spores microbiennes par le sublimé. Il résulte des recherches de l'Ecole de Copenhague,

(1) MADSEN et NOGUCHI, (1904); MADSEN, NOGUCHI et WALBUM (1906); MADSEN et NYMAN (1907); MADSEN et WATABIKI (1915); MADSEN et WULFF (1916); MADSEN et STRENG (1917)....

que l'action de la température peut être assez bien représentée par l'équation d'ARRHENIUS :

$$\frac{K_1}{K_2} = e^{\frac{\mu}{2} \left(\frac{T_1 - T_2}{T_1 T_2} \right)}$$

où K_1 = vitesse de réaction au temps T_1

K_2 = vitesse de réaction au temps T_2

$T_1 T_2$ = températures absolues

μ = constante

que l'on peut encore écrire sous une forme analogue à l'équation de VAN'T-HOFF pour la variation de la constante d'équilibre K :

$$\log \frac{K_{t_2}}{K_{t_1}} = A \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right)$$

J. BELEHRADEK pense que dans les processus biologiques, les formules de VAN'T-HOFF et d'ARRHENIUS ne sont plus applicables. Cet auteur préconise l'emploi de la formule logarithmique de forme suivante :

$$\log y = \log a - b \log x$$

où y = temps

x = température (1).

BELEHRADEK a appliqué sa formule à l'étude de phénomènes qui sont très éloignés de ceux que l'on observe en Microbiologie. De plus, la concordance entre les valeurs trouvées et les valeurs calculées dans les nombreuses recherches de l'Ecole de Copenhague est en général très suffisante, elle est même parfois remarquable, et dans plus d'une expérience physico-chimique, la concordance n'est pas meilleure (2).

Se plaçant à un point de vue moins théorique, EIJKMANN (1908) montre que si 100 % des germes d'une suspension bactérienne sont tués après un

temps t , 50 % de ces germes sont tués après un temps $\frac{t}{2}$

(1) La constante a dépend de l'unité de temps choisie, de la nature de la réaction et de l'espèce biologique envisagée; la constante b dépend uniquement de la nature de la réaction et de l'espèce biologique.

(2) Dans l'étude de l'action de la température sur la destruction des spores de *B. anthracis* par le sublimé, MADSEN et NYMAN obtiennent entre les valeurs de K calculé et de K observé une concordance remarquable.

TEMPERATURES MINIMUM, MAXIMUM ET OPTIMUM

Tout être vivant est formé de systèmes colloïdaux en voie de transformations incessantes jusqu'à un équilibre final qui est la coagulation irréversible. Dans le même ordre d'idée, J. DUCLAUX (1920) étudiant la transformation spontanée des hydrosols, constate que ces derniers présentent des changements importants bien qu'ils ne soient pas toujours perceptibles à l'œil. Il rappelle que les vaccins perdent lentement leur pouvoir curatif même à l'obscurité (p. 125). Or, on sait que l'élévation de température accroît rapidement la vitesse des réactions, elle peut donc hâter les échanges, exalter la construction ou la destruction de l'élément vivant pour arriver en un temps variable au terme final, la mort (1). En première approximation, il est permis de dire que « *la vie est la résultante de réactions catalysées en système hétérogène* ». On connaît l'importance du coefficient de température dans les réactions catalysées. Avec les enzymes, pour une élévation de température de 10° C, le coefficient est au moins égal à 2, et dans la fermentation alcoolique, le coefficient est égal à 2,8.

On sait que dans une catalyse hétérogène (exemple : protéolyse d'une substance protéique par une diastase bactérienne), c'est la plus grande des transformations qui détermine la vitesse totale des réactions. Or, la fixation de l'enzyme sur la substance transformable se ramène à un processus d'adsorption, phénomène très rapide.

Si on amène par brassage les substances réagissantes à la surface du catalyseur, l'adsorption sera pratiquement instantanée et le coefficient de température correspondra au phénomène le plus lent, l'hydrolyse de la molécule protéique. Considérons le cas de la transformation d'une substance S par les corps microbiens (catabolisme de BEIJERINCK). Dans ce cas particulier, le catalyseur intraplastidaire ne diffuse pas et la transformation de la substance S sera sous la dépendance de la « *répartition* » des plastides dans tout le système à transformer.

Dans de nombreuses réactions microbiennes, il est difficile de préciser si la diastase reste intraplastidaire ou si elle est excrétée hors de la plastide ; mais, même en admettant qu'elle doive être considérée comme une enzyme soluble, on doit néanmoins tenir compte de la dispersion des plastides dans le milieu à transformer.

(1) Dans un petit livre remarquable (Les microbes pathogènes et l'organisme animal. Conceptions nouvelles sur la symbiose somato-parasitaire), MANDEL (1923) parle fort spirituellement de « *la fièvre réaction soi-disant salutaire* ». Dans un autre ordre d'idées, il faut remarquer que les accroissements de température de quelques degrés qui caractérisent la fièvre suffisent à augmenter de 30 % ou plus la vitesse des réactions et par conséquent le métabolisme.

Considérons par exemple une culture de *B. chlororaphis* ou *B. cyanéo-fluorescens* sur milieu synthétique L₁. Au bout de quelques jours, la presque totalité du milieu de culture reste rigoureusement limpide, à l'exception de la partie supérieure où toute la végétation s'est concentrée sous forme d'une colonne liquide trouble de quelques millimètres de hauteur surmontée d'un voile plus ou moins épais suivant l'espèce considérée. L'hydrolyse de l'asparagine contenue dans ces 10 cm³ de milieu liquide sera plus ou moins rapide suivant qu'on laissera la vie se cantonner dans une infime partie de la masse liquide ou que par agitation on obligera les plastides à se répartir dans tout le milieu nutritif. Dans cette transformation de l'asparagine, la « diffusion » de toutes les plastides dans la masse liquide est un des facteurs qui régissent la vitesse de réaction; mais là encore, la température interviendra pour augmenter la vitesse de transformation. En effet, l'édification de la substance corporelle et la division des plastides, la vie active en un mot, n'est possible que dans des limites déterminées. Elle offre un maximum d'intensité à une température spéciale désignée sous le nom de température optimum. Les températures minimum, maximum et optimum de culture varient d'une espèce bactérienne à l'autre; mais il est un fait très général, c'est que la température optimum est plus voisine de la température maximum que de la température minimum, ce qui s'explique fort bien si on se rappelle que l'action de la chaleur sur les réactions peut être exprimée par une loi exponentielle. C'est d'ailleurs ce qui ressort des valeurs suivantes données par HOLZMULLER (1909) en ce qui concerne la sporulation, la germination et la croissance de *B. mycoides*.

TABLEAU V.

TEMPÉRATURE	SPORULATION	GERMINATION	CROISSANCE Largeur de la colonie 48 heures après la germination
—	—	—	—
8°	—	minimum	—
10°	—	48 h.	0,1
14°	120 h.	36	0,8
23°	68	24	2,5
29°	—	13	3,6
30°	36	11	3,8
31°	32	10 opt.	3,9
32°	35	12	3,5
35°	45	20	1,4
38°	56	—	0,5
39°	—	—	maximum
40°	—	36	—
41°	—	maximum	—

Lorsqu'on cherche la température la plus favorable aux différentes manifestations de la vie bactérienne : sporulation, germination, division cellulaire, on constate que, dans certains cas seulement, l'optimum est le même pour ces trois phénomènes. Très souvent, pour une espèce bactérienne déterminée, la température optimum diffère avec le phénomène considéré.

Cette particularité permet d'expliquer certains faits.

Pour conserver le plus longtemps possible une souche microbienne, on pourrait être tenté de la cultiver à une température voisine de sa température optimum. Or, l'expérience montre que, le plus souvent, cette opération donne des résultats désastreux. Les cultures de collection peuvent et doivent être mises quelques heures à la température optimum, mais il faut rapidement les ramener à une température plus basse (exception faite pour les germes éminemment sensibles aux variations de température).

Le maintien à la température optimum conduit rapidement : 1° à une atténuation ou à une perte totale de certaines fonctions (fonction chromogène); 2° à une diminution de la vie des Bactéries. Cela tient à ce que la température n'a pas la même action sur l'assimilation et la désassimilation. Tandis que la désassimilation croît rapidement avec la température, l'assimilation croît d'abord, passe par un optimum, puis décroît à mesure que la température augmente. Tels sont les faits que l'on observe avec un grand nombre de Bactéries chromogènes telles que *B. caryocyaneus*, *B. chlororaphis*, *B. prodigiosus*, *B. balticus*, *B. Le Monnier*.

La température optimum de culture de *B. caryocyaneus* est comprise entre 22 et 25° C. Dans cette zone de température, le germe isolé par BEIJERINCK produit, en milieu synthétique L₁, un magnifique voile et une fluorescence verte. Cette coloration gagne en profondeur avec l'âge de la culture, puis apparaît un pigment bleu qui masque peu à peu la fluorescence verte du milieu.

Dès qu'on élève la température, la végétation diminue. A 39-40° C, la végétation est irrégulière. Au premier passage, 9 à 10 % seulement des tubes placés à 39-40° C montrent un développement bactérien assez faible, les autres tubes restant limpides. Cependant, par passages successifs et sélection des tubes offrant le maximum de végétation, j'ai obtenu finalement des souches se développant très abondamment à 39-40° C. A cette température, *B. caryocyaneus* ne secrète plus aucun pigment. La perte du pouvoir chromogène coïncide avec une diminution de la vitalité de la Bactérie, car, après 50 passages à 39-40° C., la souche ne s'est plus développée.

B. caryocyaneus se multipliant encore très bien vers 10° C., je n'ai pas poussé plus loin la détermination de la température minimum de culture de ce Bacille.

Il existe donc une zone assez étendue dans l'échelle des températures où *B. caryocyaneus* paraît être en équilibre avec le milieu.

TEMPÉRATURE CRITIQUE. — TEMPÉRATURE MORTELLE ZONES MORTELLES.

Toutes les plastides d'une même suspension bactérienne ne sont pas également sensibles à l'action des différents agents physiques. C'est bien ce que laissent sous-entendre MIQUEL et CAMBIER (1902, p. 52) lorsqu'ils définissent la température critique comme étant : « *le degré de chaleur qui, sans assurer la destruction absolue des bactéries de tous les échantillons de la culture, en stérilise la moitié ou la plus grande partie. Ordinairement à quelques degrés au-dessus de cette température critique, l'espèce adulte est privée de toute vitalité* ».

E. DUCLAUX, qu'il faudrait citer à chaque instant lorsque l'on parle de microbiologie générale, a montré (1898, p. 273) « *qu'il n'y a pas, à proprement parler, de température mortelle : il y a une série de températures mortelles, dont chacune a besoin d'autant moins de temps pour produire l'effet voulu qu'elle est plus élevée; il y a ce que nous appellerons une zone mortelle. Dans l'intérieur de cette zone, on peut toujours suppléer (dans certaines limites), en prolongeant la durée du chauffage, à l'insuffisance de la température atteinte* ».

On comprend alors qu'il soit possible de déterminer la mort des plastides de deux façons : soit en les chauffant à une température constante pendant des temps variables, soit en les chauffant durant un temps constant à des températures variables, sous réserve, dans les deux cas, d'opérer à des températures convenables. Il est bien évident qu'une Bactérie qui résiste 10 minutes à 70° C pourrait être chauffée sans dommage pendant des heures à 40° C.

Cette notion, nettement mise en évidence par E. DUCLAUX, a souvent été perdue de vue; aussi de nombreux microbiologistes contemporains parlent-ils volontiers de température mortelle sans indiquer la durée du chauffage. Ces chercheurs sous-entendent peut-être un temps déterminé admis comme unité dans leur laboratoire, mais cette durée n'en reste pas moins complètement inconnue du lecteur. Certains auteurs, assez nombreux il est

vrai, précisent le temps durant lequel les suspensions sont portées aux températures élevées ; mais la durée du chauffage varie d'un expérimentateur à l'autre. C'est ainsi que, dans son étude sur les températures mortelles de 24 espèces microbiennes, STERNBERG (1892) adopte un temps de chauffage de dix minutes (1). Par contre, E. DUCLAUX choisit « *par convention* » les « *deux limites* » de 1 et 10 minutes. Les récentes publications relatives à la préparation des vaccins mentionnent souvent des temps de chauffage voisins de 60 minutes. Ces exemples montrent la nécessité absolue de préciser le temps durant lequel les Bactéries sont portées à une température déterminée. On pourrait multiplier les exemples de ce genre. Je me contenterai de schématiser en ces termes la conception d'E. DUCLAUX ; on tue une espèce microbienne en la chauffant pendant un temps t à la température T , ou durant un temps t_1 à la température T_1 (2).

Au premier abord, il peut paraître indifférent de chauffer des corps microbiens à une température (T) 62° C durant une minute (temps t) ou de les porter à la température de 52° C (T_1) durant 32 minutes (temps t_1). Il n'en est rien, tout dépend du but que l'on poursuit. L'altération de la plastide chauffée à la température T durant un temps t peut être beaucoup plus grande que celle des germes microbiens chauffés pendant le temps t_1 à la température T_1 . L'action de la chaleur suit une loi exponentielle.

Le temps de chauffage n'est pas le seul facteur dont il faille tenir compte dans la détermination de la température mortelle. Il faut envisager aussi l'espèce microbienne (Meningocoque, *B. subtilis*), la souche, l'âge de la culture (présence ou absence de formes de résistance), la nature du liquide dispersif, la concentration en corps microbiens, la masse chauffée (tube capillaire ou grand ballon), l'accès de l'oxygène et enfin le milieu utilisé pour déceler les germes survivants dans les suspensions chauffées.

Je ne puis faire une étude détaillée de tous ces facteurs. Je me contenterai de rappeler que les températures mortelles dépendent très largement du liquide dispersif des suspensions microbiennes, « *de sa teneur en sels, de son pouvoir osmotique, surtout de son acidité ou de son alcalinité* » (E. DUCLAUX, p. 288, 1898).

Assez récemment, CHEFTEL (1928) a étudié l'action du pH sur le temps de chauffage nécessaire à la destruction des Bactéries. L'influence de la nature du milieu dispersif a été particulièrement bien mise en évidence par

(1) A l'exception des *Vibrio*.

(2) $T > T_1$, $t < t_1$.

OERSKOV (1925), dans son étude relative à l'action de la chaleur sur le Bacille paratyphique. Une culture non diluée de Bacille paratyphique est beaucoup plus résistante à la chaleur qu'une suspension des mêmes plastides dans l'eau physiologique.

C'est en m'inspirant de ces faits que j'ai cherché à déterminer :

1° les zones de destruction de *B. caryocyaneus* en fonction du temps et de la température ;

2° l'allure de la destruction des plastides de *B. caryocyaneus* en fonction du temps, la température restant constante.

Ces deux séries d'expériences ont été effectuées avec des techniques un peu différentes. J'exposerai la seconde en détail et j'indiquerai en quoi la première diffère de la seconde.

RECHERCHES PERSONNELLES

TECHNIQUE UTILISÉE DANS LA DEUXIÈME SÉRIE D'ESSAIS

Les corps microbiens provenant de cultures (1) d'âge variable (2) sont lavés deux fois à l'eau physiologique, puis ils sont soumis à une agitation avec des billes de verre et à une centrifugation fractionnée afin d'obtenir une suspension homogène. Par dilution, cette suspension est amenée à une concentration de 600 millions de germes au centimètre cube (3). La suspension est donc effectuée dans l'eau physiologique.

Le chauffage est réalisé dans des tubes de verre très fin. A cet effet, des tubes de 5 millimètres de diamètre extérieur sont étirés sur environ 60 à 70 centimètres de longueur, la partie étirée mesure sensiblement 1 mm. 5 de diamètre. On donne un coup de chalumeau au milieu de la partie étirée. On a ainsi un tube de 5 mm. prolongé par un tube de 1 mm. 5 de diamètre. On étire la partie élargie (mesurant 5 mm. de diamètre), tout en respectant la cheminée de coton. Les tubes ainsi obtenus sont alors coudés à angle droit, la partie horizontale mesure 8 centimètres de lon-

(1) Cultures effectuées sur gélose-peptone de pH = 7.

(2) Cultures âgées de 24 heures, 48 heures, 4 jours, 35 jours et 51 jours.

(3) Pour ces déterminations, j'ai employé tantôt le photomètre graduel de ZEISS, tantôt un néphélomètre fondé sur l'emploi de cellule photo-électrique.

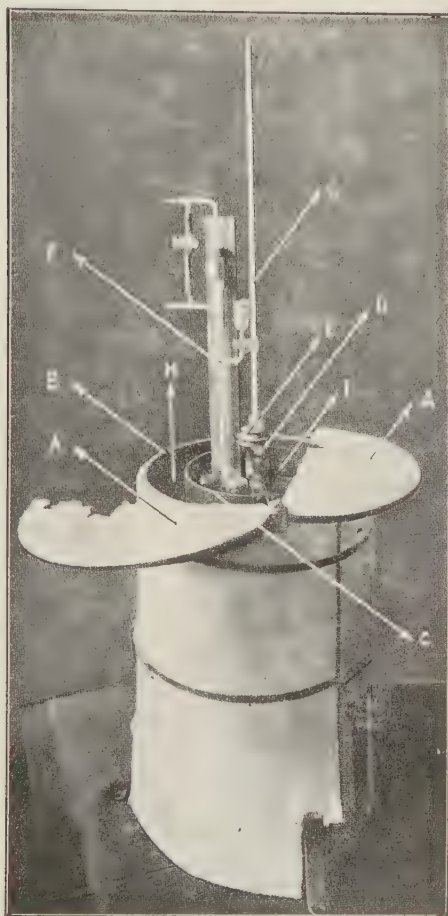


Fig. I. — Thermostat. A, couvercle recouvert d'amiante; B, cylindre calorifugé; C, cylindre interne; D, E, agitateurs; F, thermorégulateur de Barbaudy; H, I, volants d'eau; G, thermomètre.

Extrait du fascicule V (1932)
des Travaux du Laboratoire de Microbiologie

gueur et la branche verticale 20 centimètres de longueur. Les tubes, scellés à leurs deux extrémités, sont chauffés 30 minutes à 120° C. Après stérilisation, on casse les extrémités effilées, on plonge (aseptiquement) la branche verticale dans la solution à étudier. On aspire légèrement (1), le liquide monte à une hauteur d'environ 15 à 17 cm. On incline le tube de façon à éloigner la colonne liquide d'environ 2 centimètres de l'extrémité, puis on scelle à l'aide d'une petite flamme la branche horizontale et la branche verticale. Après refroidissement du verre, on redresse le tube. En opérant ainsi, on n'a pas à craindre l'action de la flamme lors de la fermeture. Ces tubes sont plongés à des temps déterminés dans des grands tubes (renfermant de l'eau distillée stérilisée) disposés préalablement dans un thermostat à température constante.

Le thermostat utilisé se compose essentiellement de deux vases cylindriques, étanches et concentriques en cuivre, mesurant respectivement 26 cm. et 16 cm. de diamètre. Les deux vases sont remplis d'eau. Dans chaque vase, la masse d'eau est brassée par un agitateur électrique. Le vase extérieur est calorifugé avec de l'amiante. Un régulateur au gaz de BARBAUDY complète l'appareil et permet d'obtenir une température constante, même pour les températures de 80° C. La figure 1, représente l'appareil ouvert.

Les essais nécessitent au moins deux opérateurs, car on doit expérimenter sur un assez grand nombre de tubes. Les temps d'immersion sont rigoureusement chronométrés et un tableau dressé à l'avance indique l'heure à laquelle on doit retirer successivement chaque tube effilé du thermostat.

Immédiatement après ce retrait, on casse les extrémités de la branche horizontale et de la branche verticale du tube effilé. On souffle légèrement à l'aide d'un caoutchouc préalablement traité par l'alcool-éther, afin de recevoir le liquide dans un petit tube stérile. Le volume de suspension chauffée doit toujours être mesurable (il varie de un à quelques dixièmes de centimètre cube) et permettre ainsi les dilutions nécessaires à l'ensemencement. En effet, même en comptant les colonies projetées à l'aide d'un dispositif spécial, la numération ne donne de bons résultats qu'à la condition d'opérer sur des plaques de gélose (2) n'offrant qu'un nombre convenable de colonies.

(1) A l'aide d'un fin caoutchouc.

(2) Cette technique n'est pas à l'abri de toute critique. OERSKOV (1925) a signalé en effet un fait très curieux. Les Bacilles « appartenant aux groupes typhique, paratyphique, paradysentérique et Coli deviennent, après chauffage, hypersensibles à l'action de l'oxygène atmosphérique ». C'est du moins ce que pense le

MÉTHODE DE NUMÉRATION DES GERMES VIVANTS APRÈS UN TEMPS
DE CHAUFFAGE DÉTERMINÉ

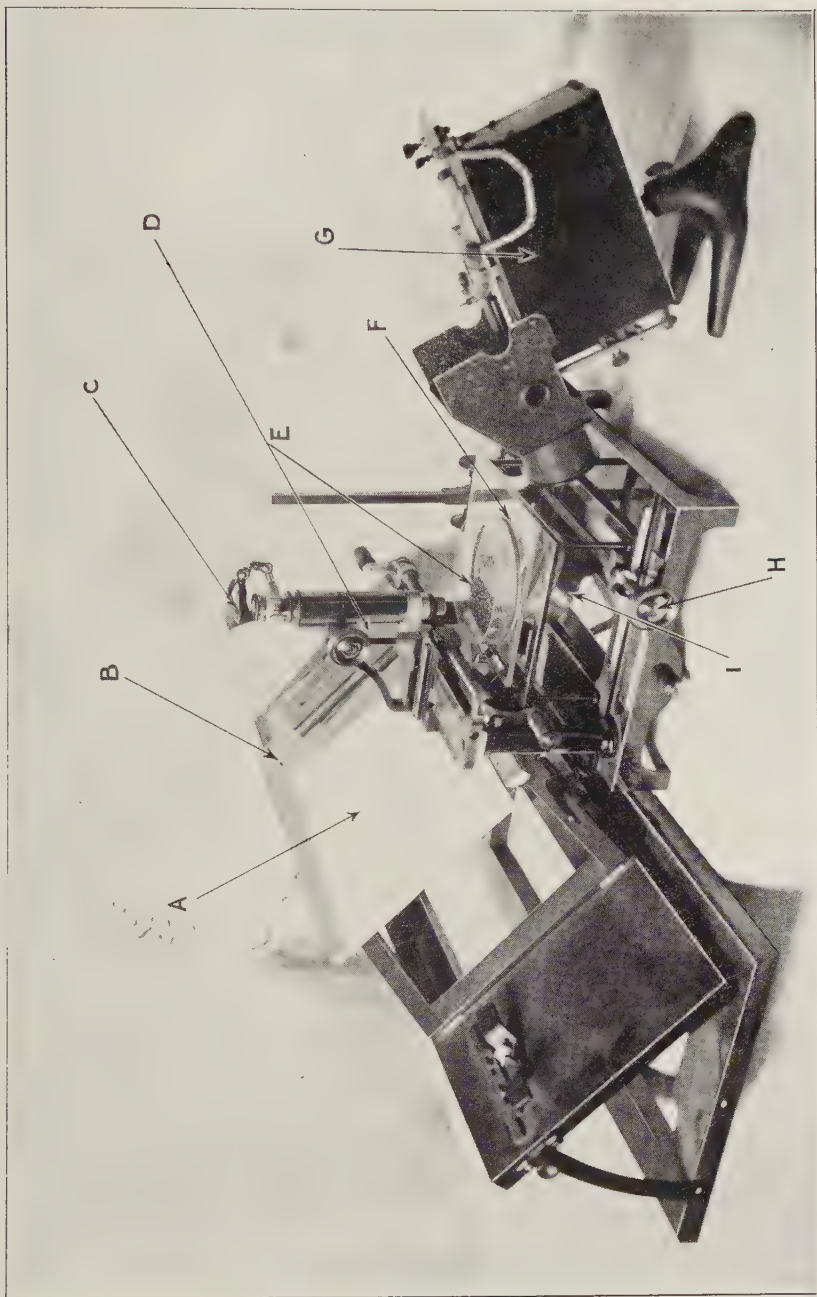
On dépose dans une boîte de Pétri, à fond rigoureusement plan, un volume déterminé de suspension diluée, puis on coule (1) une gelée nutritive composée de gélose peptone additionnée de gélatine. La gélatine a pour but d'abaisser le point de solidification de la gelée et d'éviter ainsi la destruction des germes par la chaleur. La température de la gelée est de 37° C. au moment où on la verse dans la boîte de Pétri. Les boîtes ainsi ensemencées sont placées dans une étuve à température ordinaire pour permettre le développement des colonies microbiennes. Après un laps de temps convenable, on procède à la numération des colonies. Nous avons adopté le dispositif suivant : à un microscope à chariot de NEBELTHAU on a ajouté une plaque de verre divisée en carrés, mesurant les uns 1 cm², les autres 1/9 de cm². A l'aide d'un prisme REICHERT, l'image des colonies est projetée sur une feuille blanche disposée sur un pupitre inclinable (pupitre à dessiner de ZEISS). L'éclairage est réalisé à l'aide d'une lampe à arc automatique de 5 ampères. Pour améliorer l'image, on dispose une lentille sur le trajet du faisceau lumineux réfléchi par le miroir du microscope. L'examen de la planche II, nous dispense de plus longs détails.

Lorsqu'on réalise un éclairage convenable, on projette sur la feuille de papier un quadrillage, et à l'intérieur des carrés, l'image des colonies. Il est donc facile de repérer les colonies contenues dans chacun de ces carrés. Quand on ne compte pas les colonies développées sur toute la surface d'une boîte, il faut de toute nécessité compter les colonies contenues dans un assez grand nombre de carrés. Ceux-ci d'ailleurs ne doivent pas être pris au hasard, mais en déplaçant la boîte de Pétri d'une valeur déterminée.

Toutes les colonies, superficielles ou profondes, donnent une image très

savant danois. Il faut remarquer toutefois que les faits observés à Copenhague peuvent être interprétés d'une façon différente. OERSKOV lui-même avait tout d'abord pensé que la gélose-bouillon *« est un milieu moins nutritif que le bouillon, mais aucun autre expérimentateur ne semble être de cet avis »* ; et après cette constatation, OERSKOV a abandonné sa première hypothèse, qui contient cependant une part de vérité.

(1) Aussitôt après avoir ajouté la gélose, il faut, par un mouvement combiné de bascule et de rotation, réaliser un mélange intime du liquide nutritif et du liquide à étudier.



A : feuille de papier sur laquelle ont été repérées les colonies projetées; B : pupitre inclinable de ZEISS; C : prisme à projection de REICHERT; D : microscope à numération des colonies bactériennes de LEITZ; E : boîte de PÉTRI; F : plaque de verre quadrillée; G : arc automatique (5 ampères); I : loupe.

nette. En pointant l'image de la colonie sur la feuille blanche, on réalise ainsi un document qui peut être conservé et vérifié ultérieurement.

En tenant compte de toutes ces précautions, j'ai obtenu des résultats satisfaisants dans les numérations effectuées soit sur les divers exemplaires d'un même échantillon, soit sur les différentes dilutions d'une même suspension.

TECHNIQUE UTILISEE DANS LA PREMIERE SERIE D'ESSAIS

Dans la première série d'essais, j'ai cherché à déterminer les temps de chauffage et les températures pour lesquelles toutes les plastides étaient tuées. J'ai utilisé le milieu synthétique L₁ pour déceler la présence des plastides vivantes. Ce milieu est infiniment préférable à la gélose pour la culture et la diagnose de *B. caryocyanus*.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Il faut tout d'abord remarquer que la résistance d'une Bactérie aux températures nocives (au sens d'ACHALME) peut varier légèrement d'une souche à l'autre. Je ne puis relater tous les résultats obtenus. Je me bornerai à indiquer les plus typiques.

1^o DESTRUCTION DE *B. caryocyanus* EN FONCTION DU TEMPS ET DE LA TEMPÉRATURE.

Dans cette première série d'essais, la température varie de 50° à 80° C. et le temps de chauffage d'une minute à 60 minutes.

La figure 5 schématise la vitesse de destruction des plastides en fonction de la température. En abscisse sont portées les températures et en ordonnée le temps après lequel toutes les Bactéries de la suspension sont tuées.

Avec *B. caryocyanus*, on retrouve les « zones de température mortelle » si magistralement étudiées par E. DUCLAU.

Il semble donc bien que l'action des températures nocives sur les Bactéries ne puisse pas se ramener à l'énoncé d'une température mortelle, mais

à l'établissement des températures mortelles en fonction du temps de chauffage. C'est à cette condition que l'on évitera les contradictions relevées si fréquemment dans les manuels de Bactériologie.

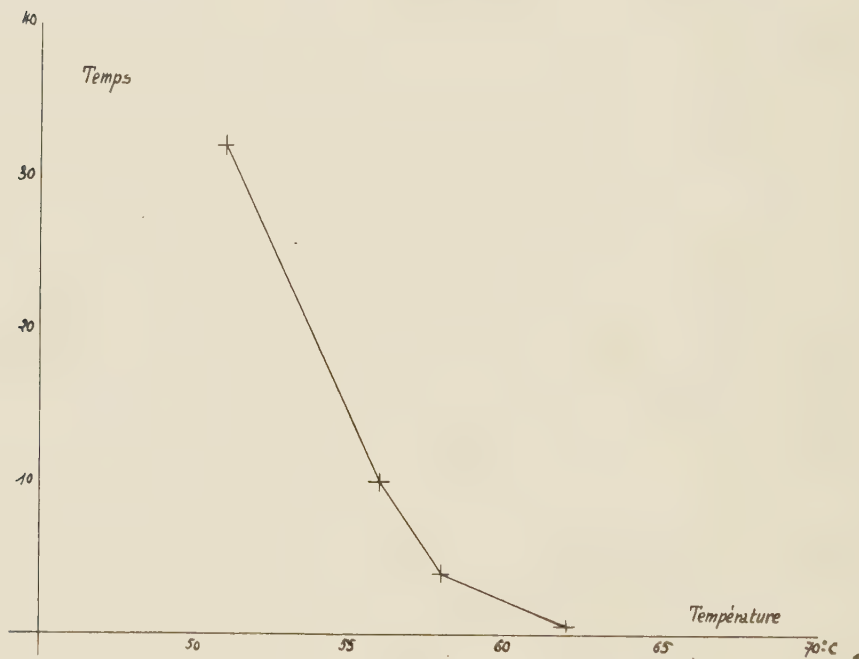


Fig. 5

Vitesse de destruction des plastides en fonction de la température.

2° DESTRUCTION DES PLASTIDES DE *B. caryocyaneus* EN FONCTION DU TEMPS, LA TEMPÉRATURE RESTANT CONSTANTE.

Le tableau suivant indique le nombre de germes survivants après des séjours variables à la température de 50°, 1 C.

TABLEAU VI.

TEMPS DE CHAUFFAGE	NOMBRE DE GERMES VIVANTS
0	600.000.000
5 minutes	2.000.000
10 minutes	1.060.200
15 minutes	400.000
20 minutes	50
25 minutes	2

Les nombres ci-dessus indiquent les germes tués après des temps variant de 5 minutes à 25 minutes. La température de 50°, 1 C. est une température relativement si élevée que même après 5 minutes de séjour à 50°, 1 C. 99, 66 % des germes sont tués. Il faudrait donc expérimenter à une température un peu plus basse (48-49° C.) pour obtenir une courbe de destruction intéressante. On peut objecter qu'il est possible d'arriver au même résultat en utilisant des temps de chauffage inférieurs à 5 minutes. Malheureusement de telles durées comportent de grandes causes d'erreur. Le dépôt et le retrait du tube (renfermant la suspension) dans le thermostat exigent un temps qui n'est pas nul. C'est pour ces raisons que l'on ne peut guère descendre au-dessous de 3 minutes de chauffage. Mais l'expérience ci-dessus peut être envisagée au point de vue de la survivance des plastides.

Alors que 598.000.000 de plastides sont tuées après 5 minutes, on retrouve encore 2 germes vivants après 25 minutes d'action de la température de 50°, 1 C. La résistance des diverses plastides d'une même souche bactérienne à une température déterminée varie donc énormément. Cette variation de résistance individuelle est un fait très général qui s'observe non seulement avec les agents physiques mais encore avec les agents chimiques et biologiques.

INFLUENCE DE L'OXYGENE

Certaines Bactéries ne peuvent manifester leur fonction chromogène qu'en présence d'oxygène libre. Il y a plus. La production de chlororaphine (*B. chlororaphis*) et de syncyanine (*B. syncyanus*) ne s'observe que lorsque la tension d'oxygène atteint une valeur convenable.

La multiplication bactérienne, elle aussi, peut être sous la dépendance de la tension d'oxygène. La formation de voile à la surface libre des milieux de culture traduit ce besoin d'oxygène.

Avec *B. chlororaphis*, les plastides restent longtemps limitées dans la couche supérieure du liquide nutritif. Les cultures de *B. chlororaphis* en milieu synthétique L₁ montrent un voile épais surmontant la colonne de liquide sensiblement limpide.

A une autre échelle d'observation ce besoin d'oxygène peut être « exprimé en nombre » et grâce aux travaux de PORODKO (1905) nous possédons des données précises sur les tensions d'oxygène maximum et minimum compatibles avec la végétation et le pouvoir chromogène de différentes Bactéries. Le tableau ci-dessous indique quelques-unes des valeurs obtenues par PORODKO.

TABLEAU VII.

DÉSIGNATION DES BACTÉRIES	TENSION MAXIMUM D'OXYGÈNE (exprimée en atmosphère)	TENSION MINIMUM D'OXYGÈNE (exprimée en volume d'O ² %)
—	—	—
<i>B. cyanogenus</i>	1.68 — 1.94	0.00016-0.06
<i>B. pyocyaneus</i>	1.81 — 2.18	
<i>B. fluor. liquefaciens</i> ..	1.94 — 2.51	0.00016
<i>B. prodigiosus</i>	5.45 — 6.32	

Alors que *B. pyocyaneus* exige une pression d'oxygène assez élevée, *B. cyanogenus* peut se contenter de tension d'oxygène moindre. Or, ces deux Bactéries présentent certains caractères communs avec *B. caryocyaneus*. Par analogie, j'ai donc été conduite à rechercher dans quelles limites l'oxygène influe sur le développement et la fonction chromogène de *B. caryocyaneus*. A cet effet, j'ai tout d'abord cultivé le germe isolé par BEIJERINCK en atmosphère limitée, puis j'ai soumis cette Bactérie à des pressions de plus en plus réduites d'oxygène. Tous ces essais de culture ont été effectués en milieu synthétique L₁ (1).

Suivant le but envisagé, j'ai adopté l'une des trois techniques suivantes : atmosphère limitée, pression réduite d'oxygène ou atmosphère de gaz inerte.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Avant de résumer les résultats obtenus, je rappellerai que, dans les conditions habituelles d'aération, *B. caryocyaneus* offre, en milieu synthétique L₁, les particularités suivantes : la Bactérie produit un voile tout d'abord blanc, mince, grimpant et une fluorescence verte dans la partie supérieure de la colonne liquide, puis en même temps qu'apparaît le pigment bleu, le voile s'épaissit, se plisse, devient grisâtre, bordé de noir et enfin noir.

J'envisagerai successivement les aspects culturels obtenus suivant le degré d'oxygénation.

1° ATMOSPHÈRE LIMITÉE. — En atmosphère limitée (tubes scellés), *B. caryocyaneus* se développe d'abord normalement. On observe en effet la

(1) Comme nous le verrons plus loin, ce liquide nutritif est, en effet, le milieu le plus favorable à la manifestation de la fonction chromogène de *B. caryocyaneus*.

formation du voile, de la fluorescence verte et du pigment bleu; mais au bout de 13 jours le développement bactérien s'arrête, on note un éclaircissement de la culture et la coloration bleue s'atténue. Après 18 jours de séjour en atmosphère limitée, la coloration bleue a complètement disparu pour faire place à une coloration jaune-brun et le liquide devient limpide. Les plastides se sont sédimentées au fond du tube.

2° PRESSIONS RÉDUITES D'OXYGÈNE. — Lorsqu'on cultive *B. caryocyanus* en présence de pressions d'oxygène de plus en plus réduites, on observe toutes les images intermédiaires entre celle de la culture en atmosphère limitée et celle de la culture en présence de gaz inerte. C'est ce qui ressort de l'examen du schéma ci-dessous :

Aspect des cultures âgées de 4 jours :

- 660 mm. : voile légèrement bordé de noir; coloration bleue de la colonne liquide sur environ 30 mm.
560 mm. : voile blanc; trouble uniforme de toute la masse liquide; légère teinte verdâtre.
460 mm., 360 mm., 260 mm. : légère pellicule; trouble uniforme de toute la masse liquide; pas de coloration.
160 mm., 110 mm. : pas de pellicule; pas de trouble apparent; pas de coloration.
20mm. : pas de développement apparent; pas de coloration.

3° ATMOSPHÈRE DE GAZ INERTE. — *B. caryocyanus* ne se développe pas en l'absence rigoureuse d'oxygène. Mais contrairement à ce que l'on pourrait croire, les processus vitaux ne sont que ralentis et non définitivement arrêtés. En effet, après 7 jours de séjour dans une atmosphère d'azote, il suffit de faire pénétrer aseptiquement l'air dans le tube privé d'oxygène pour que la Bactérie se développe normalement.

Il résulte de ces essais que *B. caryocyanus*, comme la plupart des Bactéries chromogènes, a besoin d'oxygène libre pour se développer et produire des corps colorés.

ODEUR

On sait que les cultures de *B. pyocyaneus* dégagent une odeur marquée de coumarine. Les milieux dans lesquels *B. chlororaphis* s'est développé émettent eux aussi une odeur voisine de celle de la coumarine. Par contre, toutes les cultures de *B. caryocyanus*, quel que soit le milieu utilisé, répan-

dent même à une certaine distance, une odeur putride extrêmement prononcée qui envahit non seulement les tubes, mais encore le local où se trouvent les cultures.

BIBLIOGRAPHIE

- BELEHRADEK (J.). — *C. R. Soc. biol.*, T. XCV, p. 1449-1452, 1926.
- DUCLAUX (E.). — *Traité de Microbiologie*, T. I, Microbiologie générale; Paris. Masson, p. 273, 1898.
- EIJKMANN (C.). — *Biochem. Zeitschr.*, Bd. XI, p. 13-20, 1908; Ref. *Bull. Inst. Past.*, p. 275, 1910.
- FABICKI (J.). — *Thèse Pharmacie*, Nancy, 1923.
- HOLZMULLER (H.). — *Centralbl. f. Bakt.*, Bd. XXIII, Abt. II, p. 346, 1909.
- MADSEN (Th.) et WALBUM (L.). — *Bull. Acad. royale Sciences et Lettres Danemark*, n° 6, p. 425-446, 20 mai 1904.
- MADSEN (Th.) et NOGUCHI (H.). — *Bull. Acad. royale Sciences et Lettres Danemark*, n° 6, p. 447-456, 20 mai 1904.
- MADSEN (Th.), NOGUCHI (H.) et WALBUM (L.). — *Journ. of Exper. Medic.*, Vol. VIII, n° 3, p. 337-364, 25 mai 1906.
- MADSEN (Th.) et NYMAN (M.). — Zur Theorie der Desinfektion I; *Zeitschr. f. Hyg. u. Infekt.*; Bd. 57, 388-404, 1907.
- MADSEN (Th.) et WATABIKI (T.). — *Bull. Acad. royale Sciences et Lettres du Danemark*, n° 2, p. 125-159, 1915; *Bull. Acad. royale Sciences et Lettres du Danemark*, n° 2, p. 161-170, 1915.
- MADSEN (Th.) et WULFF (O.). — *Bull. Acad. royale Sciences et Lettres du Danemark*, n°s 5-6, p. 339-350, 1916.
- MANDEL (H.). — *Les microbes pathogènes et l'organisme animal. Conceptions nouvelles sur la symbiose somato-parasitaire*; Masson, Paris, 70 pages, 1923.
- OERSKOV (S.-L.). — *C. R. Soc. biol.*, T. XCII, p. 400, 1925; *C. R. Soc. biol.*, T. XCII, p. 402, 1925; *C. R. Soc. biol.*, T. XCII, p. 1323, 1925.
- PORODKO (Th.). — *Pringsheim Jahrbücher f. Wissensch. Botanik*, T. 41, p. 1-65, 1905.

CARACTERES DE CULTURE SUR MILIEUX NON CHIMIQUEMENT DEFINIS

A. MILIEUX USUELS.

1) MILIEUX LIQUIDES:

Bouillon. — En bouillon ordinaire, *B. caryocyanus* détermine un trouble de toute la masse liquide. Les cultures montrent en outre un voile irisé, tout d'abord lisse puis plissé, grimpant aux parois du tube. Le milieu offre une fluorescence verte.

Solution de peptone. — L'aspect des cultures en solution peptonée varie avec le pH du milieu ; mais il peut se ramener au schéma général suivant : formation d'un voile, trouble de toute la masse liquide, apparition d'une fluorescence verte (d'intensité variable) et d'une coloration brune. J'indique ci-dessous les résultats obtenus au bout de 7 jours dans des cultures effectuées en ballons pour des solutions de pH suivants : pH = 5,95 ; pH = 7,30 et pH = 8.

TABLEAU VIII.

- pH = 5,95 et pH = 7,30 : voile formant draperie ; coloration brun-noirâtre de toute la masse liquide ; le liquide présente une fluorescence verte et la lumière de Wood décèle en outre la présence d'une fluorescence bleue non perceptible à l'œil.
- pH = 8 : voile ; la zone superficielle de la masse liquide offre une fluorescence verte très intense ; la zone sous-jacente est brune. A la lumière de Wood, toute la masse liquide offre une fluorescence verte très intense.

En résumé, les cultures obtenues avec des solutions peptonées de pH = 5,95 et pH = 7,30 se différencient surtout des cultures effectuées en solution peptonée de pH = 8 par une fluorescence bleue intense dans le premier cas et faisant défaut dans le second cas.

2) MILIEUX SOLIDES :

Gélose peptone. — Ensemencé en piqûres sur gélose peptone, *B. caryocyanus* ne se développe pas dans le canal d'inoculation et donne à la surface de la gelée une culture blanc-grisâtre. La partie supérieure de la gélose offre une fluorescence verte. Un pigment brun diffuse dans le milieu nutritif à mesure que les cultures vieillissent.

Sur plaques de gélose *B. caryocyanus* donne des colonies superficielles et des colonies profondes.

a) *Colonies superficielles.* — Les jeunes colonies de *B. caryocyanus* possèdent un bord entier ; dans les colonies plus âgées le bord est lobé ou profondément découpé, les colonies prennent alors un aspect des plus irréguliers. Les colonies sont blanchâtres et la gélose offre d'abord une fluo-

rescence verte qui passe au brun avec le temps. Quant à leur structure, les colonies peuvent se ramener aux trois types suivants :

1) colonies bombées à périphérie finement granuleuse et à partie centrale mamelonnée.

2) colonies à bord surélevé, à périphérie lisse et à centre plissé.

3) colonies plates, entièrement plissées.

b) *Colonies profondes*. — En dehors des colonies superficielles, on note la présence de colonies profondes, lenticulaires. Ces colonies peuvent en se développant, arriver à la surface de la gelée nutritive et affecter la forme de méduses.

Gélatine.

1) Cultures en pique. — Sur tubes de gélatine, après 18 heures de culture, on observe, au point d'inoculation, une très légère liquéfaction en entonnoir, puis la liquéfaction progresse par tranches. Après 102 jours de culture à la température de 10° C., la hauteur de la zone liquéfiée atteint 6 cm., elle offre une fluorescence verte très intense.

2) Cultures sur plaques. — Contrairement à ce que l'on observe avec beaucoup de Bactéries chromogènes, la culture de *B. caryocyaneus* sur plaques de gélatine ne fournit pas un élément de diagnose important. En raison de l'intensité du pouvoir protéolytique, le substrat nutritif est liquéfié avant que les colonies aient pu atteindre des dimensions suffisantes pour présenter un ensemble d'attributs caractéristiques. C'est la raison pour laquelle je limiterai l'étude des colonies sur gélatine aux lignes ci-dessous.

48 heures après l'ensemencement, les colonies développées à la surface de la gélatine mesurent de 1 mm. à 1 mm. 5 de diamètre. Elles sont rondes ou arrondies.

En allant de l'intérieur vers l'extérieur d'une colonie, on peut distinguer :

1) une masse centrale arrondie jaunâtre ;

2) une zone granuleuse arrondie de même teinte que la zone centrale ;

3) une zone un peu moins granuleuse, lobée, jaune-clair ;

4) une zone périphérique incolore, zone de liquéfaction sans structure.

Après 3 jours de culture, on observe des cupules où nage une masse visqueuse tenant les corps microbiens en suspension.

ETUDE DE LA LIQUEFACTION DE LA GELATINE PAR *B. CARYOCYANEUS*

I. — LIQUEFACTION DE LA GELATINE EN FONCTION DU pH.

Dès le début de la bactériologie, les gelées de gélatine ont été considérées comme des milieux nutritifs de la plus haute importance, car elles permettaient de classer les Bactéries en deux catégories : les Bactéries liquéfiantes et les Bactéries non liquéfiantes.

Malheureusement, on s'aperçut assez rapidement, qu'il existait des Bactéries qu'il est difficile de rattacher à l'un ou l'autre de ces deux groupes. Ainsi certaines souches de *Staphylococcus albus* rentrent dans le premier ou le deuxième groupe suivant la composition de la gelée nutritive et le temps d'observation. *B. Le Monnier*, peut offrir des colonies convexes, ou concaves selon l'intensité de la synérèse et la température de culture. Il serait d'ailleurs facile de multiplier les exemples de ce genre.

Rappeler que la température de solidification d'un milieu gélatiné est fonction de la température de stérilisation est un lieu commun sur lequel je n'insisterai pas ; il en est de même de l'influence des matières minérales sur le point de solidification des gelées de gélatine. Mais il est encore un autre facteur important dans l'étude du pouvoir protéolytique d'une Bactérie : c'est le pH du milieu.

LAZARUS en 1909-1910 a montré l'action des ions H^+ et OH^- (1) dans les phénomènes diastasiques en général et dans la protéolyse en particulier.

Ces recherches nous avaient conduits, M. le Professeur LASSEUR, J. MARCHAL et moi, en 1931, à rechercher l'influence du pH sur la marche de la liquéfaction de la gélatine par *B. caryocyaneus* et *B. pyocyaneus*.

Je résumerai brièvement les résultats auxquels nous sommes arrivés dans l'étude du pouvoir protéolytique de *B. caryocyaneus* dans les milieux de pH croissants. Mais auparavant je rapporterai la technique utilisée.

(1) GORBACH, dans un travail très important sur la protéolyse bactérienne (1930), a montré que *B. pyocyaneus* offre son maximum d'action protéolytique à des pH nettement déterminés. La protéolyse maximum varie avec les milieux soumis à l'action protéolytique et le temps au bout duquel on effectue les lectures.

TECHNIQUE

Les techniques préconisées pour l'étude de la protéolyse peuvent être ramenées à deux schémas :

1° dosage des produits d'hydrolyse de la molécule protéique (de WAELE et VANDEVELDE) (1905).

2° mesure de la colonne de gélatine liquéfiée (MALFITANO) (1904).

Le procédé proposé par de WAELE et VANDEVELDE a l'avantage d'être applicable à toutes les Bactéries, qu'elles liquéfient ou non la gélatine. Malgré ses avantages, nous n'avons pas adopté ce procédé, craignant en effet, que le dosage des substances de transformation ne soit pas rigoureux.

MALFITANO et ses élèves avaient préconisé l'emploi d'un tube calibré dérivé du tube de METT. Cette technique très simple, et dont la précision est fonction du calibrage et de la graduation des tubes, présente tout de même un inconvénient : certaines espèces bactériennes donnent un voile grimpant qui rend assez difficile la lecture des premiers millimètres de la colonne. On tourne cette difficulté en soulevant le tube, au moment de la lecture, au-dessus du liquide nutritif. Dans nos recherches, nous avons utilisé des tubes de verre (Pyrex) de 160 mm. de long. Ces tubes comportent 2 parties : l'une, rigoureusement calibrée de 130 mm. de longueur et de 1 mm. de diamètre interne, l'autre, élargie de 30 mm. de hauteur et de 5 mm. de diamètre interne (1).

Le mode opératoire adopté dans ces recherches a été décrit précédemment (*Etude du pouvoir protéolytique de B. caryocyanus* BEIJERINCK-DUPAIX et *B. pyocyanus* GESSARD dans les milieux de pH croissants, par Ph. LASSEUR, A. DUPAIX et J. MARCHAL, fasc. IV des *Travaux du Laboratoire*, p. 63-71, 1931). Je ne puis que renvoyer le lecteur à cette publication.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

L'étude de l'influence du pH sur la marche de la liquéfaction de la gélatine par *B. caryocyanus* fait l'objet de deux séries d'expériences.

Première série. — J'envisagerai tout d'abord l'allure de la liquéfaction de la gélatine de pH = 7,94 immergée dans des solutions peptonées de pH différents.

(1) Pour faciliter la lecture, on peut aussi utiliser des gélatines colorées légèrement par le Rouge neutre ou le tournesol, etc...

Le graphique ci-dessous schématise la marche de la protéolyse pour des solutions peptonées de pH = 5, pH = 6, pH = 7, pH = 8 et pH = 9.

Fig 6 - Liquéfaction de la gélatine par *B. caryocyanus* cultivé en eau peptonée de pH différents

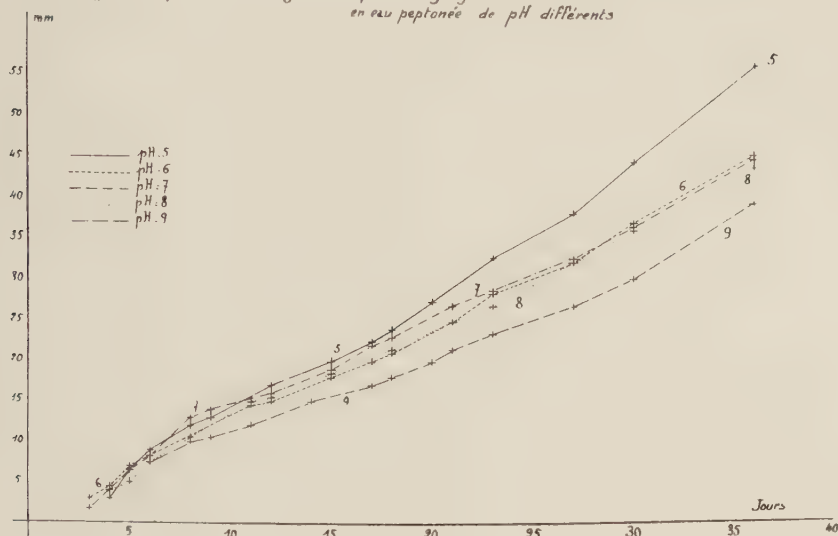


Fig. 6

Liquéfaction de la gélatine par *B. caryocyanus* cultivé en eau peptonée de pH différents.

L'examen de la figure 6 montre tout d'abord que la liquéfaction de la gélatine croît régulièrement avec le temps.

Pour la facilité de l'exposition, on peut, sans commettre d'erreur grave, considérer que la protéolyse effectuée dans des solutions peptonées de pH = 6, pH = 7 et pH = 8 offre sensiblement la même allure. Toute autre est la marche du phénomène avec les solutions peptonées de pH = 5 et de pH = 9.

Pour les liquides de pH = 5, la vitesse de liquéfaction est plus grande, et cela surtout à partir du 18^e jour, que dans les solutions peptonées de pH = 6, pH = 7 et pH = 8. Avec les liquides de pH = 9, la marche du processus est surtout différente à partir du huitième jour. Dès cette époque, on constate une diminution de la vitesse de liquéfaction.

Deuxième série. — Dans la seconde série, la gélatine de pH = 5,19, pH = 7,28, pH = 7,84, pH = 8,87 a été immergée respectivement dans des solutions peptonées de pH = 5, pH = 7, pH = 8 et pH = 9.

La liquéfaction de la gélatine est une conséquence du développement microbien, ce qui n'implique pas cependant une relation étroite entre le

pouvoir protéolytique d'une culture et la quantité de germes qu'elle renferme. C'est bien ce que semble vérifier l'expérience suivante.

En eau peptonée de pH = 5 (gélatine de pH = 5, 19), la multiplication bactérienne commence plus tardivement (1) qu'en milieu de pH = 6, pH = 7, pH = 8 ou pH = 9, et cependant au bout de 18 jours, la colonne de gélatine liquéfiée est sensiblement la même quel que soit le pH considéré.

Le tableau ci-dessous résume quelques-unes des valeurs obtenues dans la deuxième série d'expériences.

TABLEAU IX

DÉSIGNA- TION DES SYSTÈMES	pH DES SYSTÈMES PROTÉOLYTIQUES	HAUTEUR DE LA GÉLATINE LIQUÉFIÉE exprimée en millimètres après :	
		4 jours	18 jours
		—	—
A	eau peptonée pH = 5 gélatine pH = 5.19	5	8
B	eau peptonée pH = 7 gélatine pH = 7.28	0	2.5
C	eau peptonée pH = 8 gélatine pH = 7.84	3.5	8.5
D	eau peptonée pH = 9 gélatine pH = 8.87	4	7.5

Des résultats consignés dans le tableau IX, il ressort que la marche de la liquéfaction, sans être identique, est assez comparable pour les systèmes A, C, D. Par contre, en B, on note une liquéfaction plus faible qu'en A, C ou D.

Si on compare maintenant la vitesse de la liquéfaction dans les systèmes A, C, D, on constate que la vitesse la plus grande s'observe en C (eau peptonée pH = 8, gélatine pH = 7.84).

En A, B, C, D, nous sommes à un pH supérieur à 4,7 qui correspond au point isoélectrique de la gélatine, par conséquent, nous avons affaire à des gélatinates.

(1) Cette remarque concorde avec l'observation faite par MALFITANO et STRADA (1905). Ces savants ont constaté que l'accroissement en corps microbiens ne détermine pas une augmentation proportionnelle de l'activité protéolytique du liquide étudié.

Dans les premiers systèmes, une certaine partie de la gélatine ne doit pas être combinée stœchiométriquement, et l'allure de la liquéfaction en C reste une anomalie qui serait plutôt en faveur des phénomènes d'adsorption.

Si nous envisageons la liquéfaction à un autre point de vue, celui de son début, nous sommes conduits aux conclusions suivantes : la liquéfaction de la gélatine de $\text{pH} = 5,19$ commence le quatrième jour, tandis que la liquéfaction de la gélatine de $\text{pH} = 7,28$ commence le neuvième jour ou le dixième jour, quel que soit le pH de l'eau peptonéeensemencée dans les deux cas.

MALFITANO et STRADA (1905) ont montré que l'activité protéolytique du Bacille du charbon offre un maximum au-delà duquel elle va en décroissant.

Dans nos nombreuses expériences sur *B. caryocyaneus*, la courbe de protéolyse croît régulièrement avec l'âge de la culture. L'allure très régulière des courbes montre que nous n'avons pas observé de faits analogues à ceux décrits par MALFITANO et STRADA.

II. — VARIATION DU POUVOIR PROTÉOLYTIQUE AVEC LES SOUCHES MICROBIENNES.

Le pouvoir protéolytique pouvant varier suivant les souches employées, j'ai été conduite à étudier comparativement la marche de la liquéfaction de la gélatine par le type normal, la modification fluorescente et la modification achromogène de *B. caryocyaneus*. Les résultats obtenus sont schématisés dans la figure 7.

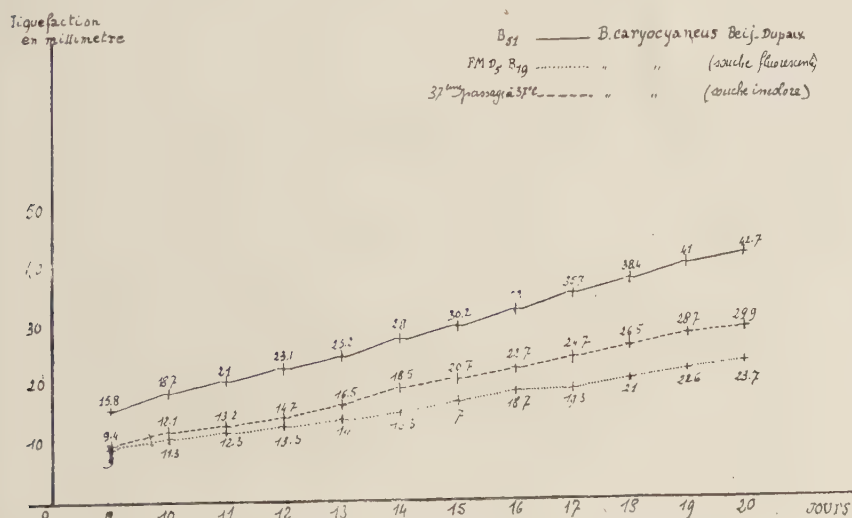


Fig. 7. — Liquéfaction de la gélatine par *B. caryocyaneus* : type normal, modification fluorescente et race achromogène.

Un coup d'œil, même rapide, sur la figure 7, suffit pour convaincre le lecteur que la marche de la liquéfaction par les trois types de *B. caryocyanus* expérimentés est analogue, mais que l'intensité de ce processus varie d'une forme bactérienne à l'autre. De plus, quel que soit le type considéré, on n'observe pas de faits semblables à ceux signalés par MALFITANO et STRADA pour le Bacille du Charbon.

CONCLUSIONS

Ces différentes expériences conduisent aux conclusions suivantes :

1° l'étude de la liquéfaction de la gélatine exige l'emploi de systèmes de pH déterminé.

2° les milieux de pH compris entre $\text{pH} = 7$ et $\text{pH} = 7,8$ paraissent offrir de nombreuses anomalies.

3° toutes les fois que les exigences culturales de la Bactérie expérimentée le permettent, il est préférable d'étudier la marche de la protéolyse dans des milieux de $\text{pH} = 5$. Pour les Bactéries plus exigeantes quant à la concentration en ions H^+ , on utilisera les milieux dont le pH oscille entre $\text{pH} = 8$ et $\text{pH} = 9$.

4° les différents types de *B. caryocyanus* offrent des variations sensibles de leur activité protéolytique.

5° dans les conditions d'expériences relatées, le pouvoir protéolytique des cultures de *B. caryocyanus* croît avec l'âge de ces dernières.

BIBLIOGRAPHIE

- ARMSTRONG (E.-F.). — in *Traité de chimie colloïdale*, R.-H. BOGUE, traduction BARBAUDY, T. I, p. 337-350, Hermann, Paris, 1928.
- GORBACH (G.). — *Archiv. f. Mikrobiol.*, Bd. I, Heft 4, p. 537-576, 1930.
- LASSEUR (Ph.), DUPAIX (A.) et MARCHAL (J.). — *Trav. Laborat. Microbiol.* Faculté Pharmacie, Nancy, fasc. IV, p. 63, 1931.
- LAZARUS. — *Ann. Inst. Past.*, T. 23, p. 577, 1910.
- MALFITANO. — *Ann. Inst. Past.*, T. 14, p. 60 et 420, 1900.
- MALFITANO et STRADA. — *C. R. Soc. biol.*, T. 57, p. 118, 1905.
- MARCHAL (J.). — *Thèse Sciences*, Nancy, p. 109, 1932.
- NELSON (J.-M.) et GRIFFIN (E.-G.). — *Journ. of Amer. chem. Soc.*, T. 38, p. 1109, 1916.
- DE WAELE et VANDEVELDE. — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Orig., Bd. 39, p. 353, 1905.
- DE WAELE. — *Bull. Acad. Roy. de Méd. de Belgique*, T. 4, 22, p. 847-854, 1908.
- WAKSMAN (L.-A.) et LOMANITZ (S.). — *Journ. of Agric. Research*, vol. 30, n° 3, p. 263-281, 1925.

Sérum de Cheval coagulé. — Le sérum de Cheval coagulé ne constitue pas un milieu très favorable au développement de *B. caryocyaneus*. Sur ce substrat, les cultures de *B. caryocyaneus* offrent l'aspect d'un enduit brillant humide et une coloration gris-ardoisé devenant gris-brun puis vert-noir.

B. caryocyaneus protéolyse énergiquement le sérum de Cheval coagulé et dans les cultures âgées de 15 jours, on observe un liquide dont la coloration varie du brun au vert-noir.

Pomme de terre. — *B. caryocyaneus* se développe bien sur pomme de terre glycinée, les tubercules sont recouverts d'un enduit luisant gris-bleu qui devient noir-vert et enfin noir cirage à reflets métalliques. Le coton supportant les tubercules offre des teintes dégradées, variant du noir au gris-vert, gris-bleu. Tel est l'aspect que l'on observe le plus souvent avec le type normal de *B. caryocyaneus*; mais il n'est pas rare, surtout avec les souches de *B. caryocyaneus* Fu, c'est-à-dire avec la modification fluorescente, d'obtenir des colorations infiniment plus faibles. Les vieilles cultures sur pomme de terre présentent alors une coloration gris-souris et seul le coton est gris-ardoisé.

Carotte. — Sur carotte, la culture de *B. caryocyaneus* est mince, humide, gris-noirâtre à reflets verts.

Dahlia. — Le germe isolé par BEIJERINCK donne, sur dahlia, une culture brillante humide, moins abondante que sur pomme de terre ou sur carotte. Certains tubercules restent incolores, d'autres présentent une teinte gris-fumée ou gris-ardoisé. La coloration est en général voisine de la teinte n° 399 du Code des Couleurs.

B. MILIEUX SPECIAUX

ALBUMINE D'ŒUF COAGULÉE. — Le milieu de culture est constitué par des cubes d'albumine d'œuf coagulée (mesurant environ 1 cm. de côté), déposés au fond de tubes à essai renfermant 2 cm³ de solution de peptone (1). Les milieux stérilisés sont ensemencés selon la méthode habituelle.

B. caryocyaneus attaque assez rapidement l'albumine d'œuf. C'est ainsi que la peptonisation des cubes est généralement totale au sixième jour de culture. On obtient alors un liquide visqueux légèrement brun présentant une fluorescence vert-jaune. Cette viscosité a été mise à profit pour étu-

(1) De pH = 7.

dier le mouvement de *B. caryocyaneus*. Le frottement interne ralentit le mouvement des Bactéries.

ACTION DE *B. caryocyaneus* SUR LE LAIT

a) Cultures effectuées en tubes à essai. — Dans ces conditions de culture, *B. caryocyaneus* donne un voile bleu-noir, grimpant aux parois du tube, surmontant la couche crémeuse qui reste blanche. Immédiatement au-dessous de cette couche blanche, on observe une zone gris-bleu ou bleu ardoisé dont l'intensité de coloration va en décroissant sur une épaisseur de 40 mm. environ, puis apparaît une série de zones foncées et claires régulièrement dégradées. *B. caryocyaneus* ne coagule pas le lait, au contraire, il peptonise le milieu. Cette peptonisation est déjà très nette après 5 jours de culture.

b) Cultures effectuées en ballons. — Dans les cultures effectuées en ballons on observe successivement (à partir de la surface libre), un voile bleu-ardoisé, une couche peptonisée d'un cm. environ d'épaisseur et de coloration bleu-ardoisé, enfin une zone opaque gris-bleu dont l'intensité de coloration va en décroissant.

Après 8 jours de culture, la zone peptonisée a augmenté d'épaisseur, elle atteint 15 à 20 mm., elle offre une coloration voisine de la teinte 404 ou 430 du Code des couleurs. Le voile grimpant, sur 10 mm. environ, offre sensiblement la même coloration (teinte 404 ou 430 du Code des couleurs), mais on note en outre la présence d'un liseré noir.

Vingt jours après l'ensemencement, la peptonisation du lait est complète. On obtient une fluorescence bleu foncé très intense.

En résumé, le lait constitue un milieu de culture assez favorable à la végétation, à la chromogénèse et à la diagnose de *B. caryocyaneus*. En effet, *B. coelicolor* (REINER-MULLER) colore le lait en bleu, mais sans peptonisation du liquide. De même *B. coeruleus* développe une coloration bleue dans le lait, mais il ne semble pas, du moins d'après la littérature, que ce germe puisse peptoniser le lait. Si le Bacille polychrome de THIRY peptonise le lait, par contre, il ne produit pas de pigment bleu et donne naissance à une matière colorante jaune sur ce liquide nutritif. Enfin avec *B. indigoferus*, on assiste bien à une coloration du lait, mais celle-ci est limitée à la couche crémeuse.

RECHERCHE DE LA DIASTASE PROTÉOLYTIQUE.

Afin de démontrer que la peptonisation du lait est bien sous la dépendance d'un ferment soluble, j'ai soumis à la filtration sur bougie L₃ des cultures de *B. caryocyaneus* âgées de 20 jours (cultures sur lait).

Il faut remarquer tout d'abord qu'une grande partie du pigment traverse la bougie L₃. Le filtrat offre, en effet, une coloration bleu-noir et une fluorescence bleu-foncé très intense. Il en est de même lorsqu'on soumet à la filtration de vieilles cultures de *B. caryocyaneus* effectuées sur eau peptonée. Celles-ci sont colorées en brun-noirâtre et possèdent une magnifique fluorescence verte et une fluorescence bleue. Le produit de filtration présente encore une fluorescence verte et une fluorescence bleue très marquées. Rappelons à ce propos que dans les expériences de NICOLLE et ZIA BEY (1896), les pigments fluorescents secrétés par *B. pyocyaneus* étaient arrêtés par cette filtration. Il est évidemment assez difficile de comparer les résultats obtenus dans les deux expériences. Les pores des bougies sont-ils de même grandeur? Dans l'affirmative, la filtration établirait donc une distinction entre les pigments fluorescents secrétés respectivement par *B. pyocyaneus* et *B. caryocyaneus*.

La lenteur de la filtration du lait peptonisé complique un peu la recherche de la diastase. Le filtrat (de pH = 6, 7) est distribué (1), dans différents milieux nutritifs susceptibles de subir des transformations marquées sous l'influence d'une diastase protéolytique. Parmi ces milieux, j'ai utilisé : le lait, la solution d'albumine d'œuf, les cubes d'albumine d'œuf coagulée.

Résultats expérimentaux.

La peptonisation du lait par le filtrat est considérablement influencée par la température. La vitesse de réaction est lente à la température du laboratoire, plus rapide à 37° C. et plus rapide encore à 40° C. A cette température en effet, la peptonisation est déjà très intense après 24 heures de contact puisqu'elle s'étend sur une hauteur de 50 à 60 mm.

Le filtrat est doué aussi d'un pouvoir peptonisant pour l'albumine coagulée et les solutions d'albumine d'œuf. Ces dernières solutions opalescentes deviennent translucides après 24 heures d'action du filtrat. Après 3 jours de séjour à 40° C., les cubes d'albumine deviennent translucides sous l'action du filtrat.

En résumé, les filtrats de vieilles cultures sur lait de *B. caryocyaneus*

(1) A raison de 1 cm³ de filtrat pour 10 cm³ de milieu.

sont doués de pouvoir protéolytique pour le lait, les solutions d'albumine et les cubes d'albumine d'œuf coagulée.

EAU PEPTONÉE ROUGE NEUTRE.

La solution de peptone, glucosée (à 0,2 %), additionnée de Rouge neutre ne subit pas de modifications sensibles lorsqu'elle est ensemencée avec *B. caryocyaneus*. La végétation se traduit par l'apparition d'un voile à la surface du liquide. On n'observe pas de dégagement gazeux, ni le virage du Rouge neutre au jaune canari. La matière colorante est en grande partie précipitée et la culture offre une teinte brun-rouge.

RECHERCHE DE L'INDOL.

Généralités.

Certaines Bactéries ont la faculté de pousser assez loin la dislocation du tryptophane et de mettre l'indol en liberté. Aussi, les bactériologistes divisent-ils les Bactéries en deux groupes : celles qui produisent et celles qui ne produisent pas d'indol.

Quelques chimistes ont mis en doute la présence d'indol (I) dans les cultures des Bactéries dites indologènes. Je n'ai pas à prendre part à cette discussion. J'envisage la fonction indologène comme un élément de diagnose, rien de plus. Même si la coloration rose (réaction de SALKOWSKI) et la coloration violette (réaction d'EHRlich) observées avec le Colibacille n'étaient pas imputables à l'indol, elles n'en resteraient pas moins, pour nous bactériologistes, un précieux caractère d'identification des Bactéries dont nous devons tenir compte même dans l'étude des germes chromogènes. Grâce à la production ou à la non production d'indol, il est possible de différencier entre elles certaines Bactéries fluorescentes et c'est dans cet esprit que j'ai étudié la production d'indol par *B. caryocyaneus*.

Technique.

Les solutions de peptone que j'ai utilisées dans ces recherches, renferment deux éléments essentiels : la peptone et les électrolytes.

J'envisagerai tout d'abord l'influence de la nature de la peptone.

(I) Pour FRIEBER, il est vrai, la désagrégation du tryptophane jusqu'à l'indol se ferait en deux étapes : la première irait du tryptophane à l'acide indol-acétique (réaction de SALKOWSKI positive), et la deuxième de l'acide indol-acétique à l'indol (réaction d'EHRlich positive). Extrapolant ses résultats, FRIEBER va plus loin et il pose en principe que le premier stade de la désintégration du tryptophane pourrait être atteint par toutes les Bactéries.

Influence de la nature de la peptone.

De par leur mode de préparation et par les matières premières mises en œuvre, les peptones sont des produits nutritifs dont la composition varie considérablement d'un échantillon à l'autre.

Afin de pouvoir affirmer qu'une Bactérie ne donne pas d'indol, il est indispensable d'ensemencer comparativement les solutions de peptone avec le germe à étudier et avec une Bactérie témoin, par exemple le Colibacille qui est, on le sait, doué d'une fonction indologène très marquée. Dans mes essais, j'ai employé comme témoin une souche de Colibacille (conserves) de l'Institut Pasteur de Paris.

Influence des électrolytes.

Les travaux de PÉRÉ (1892), SELTER (1909) ont montré que l'addition de phosphate de soude et de sulfate de magnésie aux milieux de culture favorise la production d'indol. Il est donc à présumer que le phosphate de soude et le sulfate de magnésie interviennent en exaltant la végétation (1) et de ce fait en augmentant la dislocation du complexe tryptophanique.

La composition des solutions nutritives que j'ai utilisées peut se ramener aux quatre schémas suivants :

Solution n° 1: Peptone CHAPOTEAUT 2 gr. Eau distillée 100 gr.

Solution n° 2: Peptone BYLA 2 gr. Eau distillée 100 gr.

Solution n° 3: Peptone CHAPOTEAUT 2 gr. Sulfate de magnésie 100 mmgr.
Phosphate de soude 500 mmgr. Eau distillée 100 gr.

Solution n° 4: Peptone BYLA 2 gr. Sulfate de magnésie 100 mmgr. Phosphate de soude 500 mmgr. Eau distillée 100 gr.

Après des temps de culture variant de 5 à 15 jours on procède à la recherche comparative de l'indol dans des cultures de *B. caryocyaneus* et de Colibacille. Cette opération est effectuée soit directement sur la culture en utilisant la réaction de SALKOWSKI (2), soit après extraction à l'éther (concentration de la solution éthérée dans le vide et entraînement de l'indol à la vapeur d'eau) en ayant recours à la réaction d'EHRlich.

(1) De nombreux travaux relatifs à l'action des électrolytes sur la perméabilité de la membrane permettraient d'interpréter d'une façon un peu différente le rôle du phosphate de soude et du sulfate de magnésie dans la production d'indol. Ces deux électrolytes pourraient intervenir en modifiant la perméabilité de la membrane bactérienne et par suite la diffusion de certaines diastases qui seraient à la base de la fonction indologène.

(2) Le lecteur trouvera, dans la thèse de mon camarade Jacques SPILLMANN, des renseignements très détaillés sur la recherche de l'indol dans les cultures bactériennes.

Résultats expérimentaux

Les résultats obtenus dans ces essais peuvent se résumer de la façon suivante :

TABLEAU X

B. caryocyaneus:

- Solution n° 1 (Peptone CHAPOTEAUT) = réaction négative.
Solution n° 2 (Peptone BYLA) = réaction négative.
Solution n° 3 (Peptone CHAPOTEAUT + électrolytes) = réaction négative.
Solution n° 4 (Peptone BYLA + électrolytes) = réaction négative.

B. coli communis:

- Solution n° 1 (Peptone CHAPOTEAUT) = réaction négative.
Solution n° 2 (Peptone BYLA) = réaction positive (légère coloration).
Solution n° 3 (Peptone CHAPOTEAUT + électrolytes) = réaction négative.
Solution n° 4 (Peptone BYLA + électrolytes) = réaction positive (coloration très intense).

Il résulte de ces essais :

- 1) que *B. caryocyaneus* est incapable de désintégrer la molécule protéique pour arriver à libérer l'indol.
- 2) que la souche de Colibacille utilisée est sensible à la nature de la peptone.
- 3) que les électrolytes employés favorisent la production d'indol par *B. coli communis*.

Si nous examinons maintenant la production d'indol dans la série des des Bactéries chromogènes bleues, nous constatons que *B. pyocyaneus* (1) (GAUTHIER, 1912) et *B. Le Monnier* (LASSEUR, 1912) ne produisent pas d'indol. Par contre, les cultures de *B. syncyaneus* donneraient la réaction de SALKOWSKI. Or on connaît les réserves faites par FRIEBER sur la validité de cette réaction dans la caractérisation de l'indol.

(1) MONIS aurait constaté la présence d'indol dans les cultures de *B. pyocyaneus* âgées de 15 jours; mais l'auteur ne paraît pas s'être mis à l'abri des causes d'erreur (dues au pigment) en entraînant l'indol par l'éther et nous nous rangeons à la conclusion de GAUTHIER.

BIBLIOGRAPHIE

- BAUMSTARK. — *Münch. medic. Wochenschr.*, n° 17, 1903.
 EHRLICH. — *Deutsch. medic. Wochenschr.*, n° 15, 1901.
 GAUTHIER (L.). — *Thèse Pharmacie*, Lyon, 100 pages, 1912.
 GRUBS et FRANCIS. — *Bull. of hygienic Laboratory*, Washington, 1902.
 NONOTTE et DEMANCHE. — *C. R. Soc. biol.*, p. 658, 1908.
 PÉRÉ. — *Ann. Inst. Past.*, T. 6, p. 512, 1892.
 PORCHER (Ch.). — *Biol. médicale*, juin-juillet 1909.
 SCHMIDT. — *Münch. medic. Wochenschr.*, n° 17, 1903.
 SELTER. — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Orig., Bd. 51, p. 465-476, 1909.

FERMENTATION DES SUCRES

On connaît le rôle fondamental de la fermentation des glucides et des alcools polyatomiques dans l'identification de différents groupes de Bactéries pathogènes. Afin de différencier *B. caryocyanus* de certaines espèces voisines, j'ai étudié l'action de *B. caryocyanus* sur quelques sucres.

Technique.

A cet effet, une solution peptonée à 1 % (de pH = 7) est distribuée dans des tubes à essai à raison de 9 cm³ de milieu nutritif par tube. Après stérilisation on ajoute aseptiquement 1 cm⁴ d'une solution tournesolée (1) d'hydrate de carbone dont la concentration est telle que la teneur finale du système en hydrate de carbone soit de 2 %. Les tubes sontensemencés avec une suspension de plastides provenant d'une culture sur gélose âgée de 24 heures.

Les résultats obtenus dans ces essais sont schématisés dans le tableau suivant :

TABLEAU XI
Aspect des cultures de *B. caryocyanus*
en présence d'hydrates de carbone

DÉSIGNATION des glucides	COLORATION DU MILIEU TOURNESOLÉ APRÈS :				
	24 heures	48 heures	3 jours	4 jours	5 jours
Xylose.....	bleue	rouge	rouge	rouge	rouge
Arabinose...	bleue	bleue	rouge	rouge	rouge
Glucose.....	rouge	rouge	rouge	bleue	bleue
Galactose...	bleue	rouge	rouge	rouge	rouge

(1) « Le mot fermentation... vient de fervere bouillir » (E. DUCLAUX, 1898, p. 1), il implique donc un dégagement gazeux. Cependant l'usage veut que l'on désigne sous le nom de fermentation des processus où il n'y a pas de dégagement gazeux apparent et c'est pour cela que l'on ajoute un indicateur au milieu de fermentation.

L'examen de ce tableau montre que *B. caryocyaneus* fait fermenter le xylose, l'arabinose, le glucose et le galactose. La mannite, la dulcité, l'isodulcité, le lévulose, le saccharose, le lactose, le maltose, l'inuline et la dextrine ne sont pas touchés.

En ce qui concerne le glucose, l'acidification rapide du milieu est suivie d'une alcalinisation qui se traduit par un retour au bleu de la solution de peptone tournesolée.

Afin de préciser l'allure de la fermentation, j'ai procédé à la détermination électrométrique du pH des milieux de culture après des temps variables. Dans ces essais, les cultures étaient réalisées dans des ballons, on pouvait ainsi prélever un volume de liquide convenable permettant d'effectuer la mesure du pH.

Le tableau suivant indique la marche de la fermentation du glucose, du galactose, du xylose et de l'arabinose.

TABLEAU XII

DÉSIGNATION des glucides	pH DES CULTURES APRÈS DES TEMPS VARIABLES			
	0 heure	24 heures	48 heures	3 jours
Xylose	7,3		6,55	
Arabinose.	7,2		6,9	6,7
Glucose	7,3	6,3		7
Galactose	7,2	7,1	6,45	6,5

Il résulte de la lecture des tableaux ci-dessus que *B. caryocyaneus* est un ferment relativement peu actif, car, s'il fait fermenter 4 glucides (xylose, arabinose, glucose, galactose) il ne dégage jamais de gaz et l'acidification de la culture est relativement faible.

Cette acidification est de l'ordre de celle que provoque *B. pyocyaneus* ensemencé en milieu glucosé. Ce germe abaisserait le pH de la culture à 6,7 dans les expériences de J. SUPNIEWSKI (1923).

B. caryocyaneus attaque un plus grand nombre de pentoses et d'hexoses que *B. syncyaneus*. En effet, dans les expériences de GESSARD (1891), de Didier SIMON (1908) et de MILDENBERG (1922), le Bacille du lait bleu fait fermenter le glucose. Dans les essais de Didier SIMON cette Bactérie respecte le xylose. *B. indigonaceus* ne ferait pas fermenter le glucose, le saccharose et le maltose. Le Bacille polychrome (THIRY, 1900) ne produirait

pas de gaz en milieu additionné d'hydrate de carbone, cependant il semblerait que sur milieux glucosés ou sur amidon, il y ait « *production d'acides ou corps agissant comme des acides* ». Enfin *B. indigoferus* n'attaquerait pas la glycérine, le glucose et le saccharose (THIERY).

POUVOIR REDUCTEUR (1) DE *B. CARYOCYANEUS*

On sait que différentes matières colorantes (Bleu de méthylène, tournesol, etc.) sont transformées en leucodérivés par un grand nombre de Bactéries et récupèrent leur couleur primitive par agitation à l'air. Certaines Bactéries chromogènes sont même capables de décolorer, par réduction, les pigments qu'elles secrètent, c'est le cas de *B. pyocyaneus*, *B. indigoferus*, *B. viridis*. Il est vrai que la plus grande partie des autres Bactéries chromogènes sont sans action sur leur pigment.

Le pouvoir réducteur des Bactéries peut s'exercer sur d'autres substances et conduire à la formation d'hydrogène sulfuré aux dépens de protéines, sulfites, thiosulfates, tétrathionates (2). La production d'hydrogène sulfuré est surtout importante avec les cultures de Bactéries anaérobies.

Enfin, les germes bactériens peuvent réduire les nitrates en nitrites et aller même jusqu'au dégagement d'azote. La formation de nitrites est une fonction très répandue chez les Bactéries. J'envisagerai donc successivement la réduction des nitrates et la formation d'hydrogène sulfuré par *B. caryocyaneus*.

ACTION SUR LES NITRATES

Dans ses recherches classiques sur les fonctions biochimiques des Bactéries, GRIMBERT seul (1899-1903) ou en collaboration avec BAGROS (1909) a montré tout le profit que l'on pouvait tirer de la réduction des nitrates dans la diagnose des Bactéries.

Certaines Bactéries ne possèdent pas de propriétés réductrices vis-à-vis des nitrates alcalins, tandis que d'autres, au contraire, les réduisent en nitrites. Quelques-unes même, poussant plus loin leur action, décomposent entièrement les nitrates et provoquent un dégagement d'azote.

(1) « *Les réductions produites par les microbes peuvent être basées sur une désoxydation ou sur une hydrogénation. Pour les substances actives de ces phénomènes, c'est-à-dire pour ces parties constitutives du protoplasme (endoenzymes) qui sont le siège de ces actions, je recommande les noms « réductase » et « hydrogénase ».* Ce ne sont toutefois pas des enzymes ordinaires, puisqu'ils deviennent inactifs sous l'action des anesthésiques. » (BEIJERINCK, 1903-1904).

(2) On sait que le soufre, les sulfites et les thiosulfates sont transformés très facilement en hydrogène sulfuré par les Bactéries du groupe Colibacille.

Nous avons vu que *B. caryocyaneus* se montrait très avide d'oxygène, il était donc intéressant de rechercher à quel groupe appartenait le germe isolé par BEIJERINCK.

Dans mes recherches, j'ai, suivant les conseils de GRIMBERT (1903), cultivé *B. caryocyaneus* en solution de peptone nitratée (de pH = 7,2).

Les cultures ont été réalisées non seulement en tubes à essai, mais encore dans des ballons complètement remplis de liquide et reliés par un tube adducteur à une éprouvette pleine de mercure.

Dans ces expériences les nitrites n'apparaissent qu'après un mois de culture, mais on ne peut pas expliquer la lenteur de la réduction par les conditions d'oxygénation défavorables dans lesquelles on cultive *B. caryocyaneus*. En effet, les cultures effectuées en tubes à essai et qui par conséquent sont au contact de l'air, offrent elles aussi une réaction très lente. Ainsi, après 15 jours de culture, 3 tubes seulement sur 15 tubesensemencés donnent une réaction positive. Et au bout d'un mois 32 tubes de culture, sur 32 tubesensemencés, renferment des nitrites.

En résumé, *B. caryocyaneus* réduit très lentement les nitrates en nitrites ; mais cette réduction n'atteint pas le dégagement d'azote. *B. caryocyaneus* est donc doué d'un pouvoir réducteur infiniment plus faible que celui de *B. pyocyaneus* et de *B. Le Monnier*.

PRODUCTION D'HYDROGÈNE SULFURÉ

Les cultures de *B. caryocyaneus* dégageant une odeur putride, j'ai recherché si cette Bactérie est capable de produire de l'hydrogène sulfuré.

J'ai utilisé comme milieu de culture les solutions suivantes :

Solution n° 1 : Peptone CHAPOTEAUT 2 gr. — Eau distillée 100 gr.

Solution n° 2: Peptone CHAPOTEAUT 2 gr. — Soufre lavé 500 mmgr. — Eau distillée, 100 gr.

Solution n° 3: Peptone BYLA 2 gr. — Eau distillée 100 gr.

Solution n° 4: Peptone BYLA 2 gr. — Soufre lavé 500 mmgr. — Eau distillée 100 gr.

Ces différentes solutions sont distribuées dans des fioles coniques (dites d'ERLENMEYER), obturées par des bouchons auxquels sont attachées des bandelettes de papier au sous-acétate de plomb (1).

Dans ces conditions d'expérience, on constate un dégagement d'hydrogène sulfuré dans toutes les cultures. Remarquons cependant que le noirnoircissement du papier est beaucoup plus intense avec les cultures effectuées

(1) HOLLANDE a préconisé l'emploi de papiers réactifs qui ont rendu de grands services pendant la guerre.

dans les milieux additionnés de soufre que dans les solutions non additionnées de soufre.

La présence d'hydrogène sulfuré dans les cultures de *B. caryocyaneus* a aussi été recherchée à l'aide d'une réaction recommandée par FISCHER. Cette réaction très sensible est fondée sur la formation de Bleu de méthylène.

Les cultures sont distillées en présence d'acide oxalique. Le distillat est additionné de sulfate de diméthylparaphénylène diamine et de chlorure ferrique. La présence d'hydrogène sulfuré se traduit par la production de Bleu de méthylène et l'apparition d'une coloration bleue.

La littérature relative à la production d'hydrogène sulfuré par les Bactéries chromogènes bleues est extrêmement réduite. C'est ainsi que l'on trouve que *B. coeruleus* (VOGES, 1893) est un faible producteur d'hydrogène sulfuré, tandis que *B. indigonaceus* (CLAESSEN) et *B. indigoferus* (VOGES) n'en produiraient pas.

La formation d'hydrogène sulfuré par *B. caryocyaneus* fournit donc un nouvel élément de différenciation du germe isolé par BEIJERINCK et des espèces voisines.

BIBLIOGRAPHIE

- BEIJERINCK. — *Archives des Sciences exactes et naturelles*, Haarlem, série II, T. IX, p. 131-157, 1904; Versamelde Geschriften van M. W. BEIJERINCK ter gelegenheid van zijn 70 sten Verjaardag. *Vierde Deel*, p. 192-211, Delft 1921.
- GRIMBERT (L.). — *Ann. Inst. Past.*, T. 13, p. 67, 1899; *Thèse médecine*, Paris, 1903.
- GRIMBERT (L.) et BAGROS (M.). — *C. R. Soc. biol.*, t. LXVI, p. 760, 1909.
- LASSEUR (Ph.). — *Thèse Sciences naturelles*, Nancy, p. 44, 1911.
- PACHECO (G.) et Toledo MELLO (J.). — *C. R. Soc. biol.*, T. CX, p. 131-132, 1932.

CULTURE DE *B. CARYOCYANEUS* SUR MILIEUX CHIMIQUEMENT DEFINIS

L'aspect des cultures bactériennes est sous la dépendance de la composition du liquide nutritif, on ne peut donc songer à obtenir une constance des caractères de culture qu'en plaçant le germe dans des milieux identiques. Cette condition d'expérience est irréalisable avec les milieux dont la composition varie suivant l'origine, le mode de préparation, etc... Tel est le cas des milieux usuels. Il n'en est pas de même lorsqu'on s'adresse aux « milieux synthétiques » formés de corps chimiquement purs. Je sais

que l'on peut longuement discuter sur le concept de corps chimiquement purs. Les philosophes pensent que ce concept est « *une création de savants* » (A. METZ, 1928) (1). Je me garderai bien de prendre part à cette discussion et il m'importe peu que le corps soit rigoureusement pur ou non, il me suffit que les impuretés qu'il renferme ne soient pas perceptibles à l'échelle de mes observations.

Dans les essais que je vais relater, j'ai plus particulièrement en vue l'étude de la chromogénèse. Cependant la fonction chromogène étant une particularité de la plastide vivante, je suis conduite à étudier l'action des différents éléments non seulement sur la fonction chromogène, mais encore sur la végétation de *B. caryocyanus*.

La nutrition peut être étudiée par deux méthodes : méthode analytique et méthode synthétique. Mais l'étude de la fonction chromogène s'accommode beaucoup mieux de la méthode synthétique qui consiste à cultiver les Bactéries dans un milieu de composition connue, puis à supprimer successivement les constituants du milieu. On recherche ainsi l'influence de la suppression d'un de ces éléments, soit sur le rendement en corps microbiens, soit sur le rendement en corps colorés. Cette méthode appliquée par RAULIN (1870) a connu un succès qui ne s'est jamais démenti. Malheureusement le liquide de RAULIN ne convient pas à la culture de *B. caryocyanus* et c'est la raison pour laquelle j'ai adopté les milieux synthétiques I et II de LASSEUR, milieux dont j'indique ci-dessous la composition (2).

Milieu synthétique I de LASSEUR :

Asparagine	0.900 gr.
Glycérine	2,500
Phosphate bipotassique	0,250
Sulfate de magnésium	0,500
Chlorure de calcium	0,040
Sulfate ferreux	0,010
Soude N/10	8 cm ³
Eau distillée ($K = 1.10^{-6}$) q. s. pour 100 cm ³	

Milieu synthétique II de LASSEUR :

Asparagine	0,900 gr.
Succinate d'ammonium	0,100
Glycérine	2,000

(1) Si le concept de corps pur devait être mis en doute par un expérimentateur, il en serait forcément de même de tous « *les concepts généraux dont on se sert dans l'énoncé des lois physiques* ».

(2) Au cours de ce travail, je désignerai ces milieux par les expressions : milieux L_1 et milieu L_2 .

Glucose	1,000
Phosphate bipotassique	0,250
Sulfate de magnésium	0,500
Chlorure de calcium	0,040
Sulfate ferreux.	0,010
Soude N/10	8 cm ³
Eau distillée (K = 1.10^{-6}) q. s. pour 100	cm ³

Pour donner un tableau complet du métabolisme bactérien, il faudrait étudier successivement l'aliment azoté, hydrocarboné et minéral. De nombreux travaux, et en particulier ceux de LASSEUR ont précisé le rôle de l'aliment azoté dans la vie des Bactéries chromogènes. L'étude de l'influence de l'élément azoté dans la vie de *B. caryocyaneus* perd ainsi une grande partie de son intérêt, c'est pour cela que je me suis limitée à définir dans quelle mesure la suppression de l'aliment hydrocarboné et de l'aliment minéral modifiait la croissance et le pouvoir chromogène de *B. caryocyaneus*.

J'ai surtout donné un développement important aux essais effectués avec les éléments minéraux. Des expériences antérieures relatives à l'action des électrolytes sur différents processus vitaux m'avaient familiarisée avec des recherches de ce genre. De plus, c'est avec les produits minéraux que l'on a le plus de chances d'opérer dans la zone des faibles concentrations et d'éliminer ainsi les complications inhérentes à l'emploi des fortes concentrations.

Le rôle de traces d'électrolytes ou action des « *infiniment petits chimiques* » a été résumé par J. DUCLAUX (1920) (1) dans son ouvrage magistral sur la « *Chimie de la matière vivante* ». Brillant continuateur de l'œuvre d'E. DUCLAUX, J. DUCLAUX signale tout d'abord les recherches classiques de J. RAULIN, sur *Aspergillus niger*, établissant que 1/5.000.000 de zinc augmente considérablement la récolte de l'*Aspergillus*. Dans les expériences postérieures dues à G. BERTRAND, JAVILLIER et AGULHON, la « *disproportion entre la cause et l'effet est encore augmentée* », puisque l'addition de 1/25.000.000 de zinc accroît encore la récolte de l'*Aspergillus* de plus de la moitié de sa valeur. Et J. DUCLAUX pense que l'activité des « *infiniment petits chimiques* » doit trouver son origine dans la sensibilité des diastases aux traces d'éléments ; en effet 1/5.000 de cyanure de potassium réduit au 1/16 l'activité de la sucrase (E. DUCLAUX).

L'influence de traces d'éléments sur la nutrition des microorganismes comporte de nombreuses causes d'erreur signalées déjà par RAULIN, G.

(1) J. DUCLAUX, *Chimie de la matière vivante*, ALCAN, Paris, 1920, p. 200.

BERTRAND' et ses élèves. Etant données ces causes d'erreurs on ne peut donc pas affirmer que l'on opère en l'absence rigoureuse d'un élément, mais on peut assurer que l'on s'est efforcé de réduire le plus possible l'apport accidentel de l'élément en question. Sous ces réserves j'emploierai cependant au cours de chapitre les expressions de « *milieu sans fer* », « *milieu sans magnésium* », etc...

RECHERCHES PERSONNELLES

TECHNIQUE

Dans ces recherches, j'ai utilisé des produits purifiés par LASSEUR lors de ses recherches sur le rôle du fer dans la production des pigments. Les vases en verre résistant ont été soumis à des lavages soigneux à l'eau de conductibilité $K = 1.10^{-6}$. Il est évident que tout contact de ces vases, avec des objets en fer, a été rigoureusement évité.

Il est indispensable d'utiliser de l'eau distillée dans des appareils de verre ou d'étain, le cuivre pouvant fonctionner comme peroxydase. Il y a plus, la présence simultanée du cuivre et du fer augmente considérablement la puissance des peroxydases (ROBERTSON, 1925; WURMSER, 1930).

La glycérine a été distillée à 174° - 175° C. sous $H = 11$ mm. par notre vénéré Maître M. le Professeur FAVREL.

L'ensemencement a été réalisé à l'aide d'une suspension bactérienne (renfermant environ 50 millions de germes au cm^3) effectuée dans l'eau de conductibilité. Ces précautions n'empêchent pas un léger apport d'électrolytes lors de l'ensemencement, aussi est-il nécessaire de faire au moins trois séries de passages sur le milieu à étudier. Ce n'est guère que vers le troisième passage que les résultats s'inscrivent toujours dans le même sens.

ASPECT DE LA CULTURE DE *B. caryocyaneus* SUR MILIEU SYNTHÉTIQUE L_1

Lorsqu'on ensemence *B. caryocyaneus* sur milieu synthétique L_1 , on observe (après 24 heures de culture), la formation d'une matière colorante verte fluorescente (1) avec production d'un voile mince à la surface du liquide. 48 heures après l'ensemencement la zone fluorescente verte a augmenté d'étendue, sa hauteur atteint 10 à 12 millimètres. On note en outre l'apparition d'un pigment bleu. A partir de ce stade d'évolution de la culture, le pigment bleu masque la fluorescence verte. La culture âgée de 15

(1) Sur une colonne de liquide de 1 à 2 mm. de hauteur.

Fig. 1. — Modification fluorescente de *B. caryocyaneus*. Culture âgée de 4 jours effectuée sur milieu L₁.

Fig. 2, 3, 4. — Type B ou normal de *B. caryocyaneus*.

Fig. 2. — Culture âgée de 4 jours effectuée sur milieu L₁.

Fig. 3. — Culture âgée de 7 jours.

Fig. 4. — Culture âgée de 25 jours.

Fig. 5. — Culture de *B. caryocyaneus* type normal effectuée sur milieu L₁ non additionné de fer et âgée de 15 jours.

- Fig. 5. — Culture de *B. carposynensis* type normal effectuée sur milieu
 L. non additionné de fer et âgée de 15 jours.
- Fig. 4. — Culture âgée de 25 jours.
- Fig. 3. — Culture âgée de 7 jours.
- Fig. 2. — Culture âgée de 4 jours effectuée sur milieu L.
- Fig. 3. 4. — Type B ou normal de *B. carposynensis*.
- Fig. 1. — Modification fluorescente de *B. carposynensis*. Culture âgée
 de 4 jours effectuée sur milieu L.

BACILLUS CARYOCYANEUS Beijerinck



Fig. 1



Fig. 2



Fig. 3



Fig. 4



Fig. 5

jours montre un voile plissé grisâtre bordé de noir ; le liquide est coloré en bleu intense et par transparence, on perçoit une coloration violet-rouge. Les cultures plus âgées sont noires par réflexion et brun-rouge par transparence. Ces différents aspects d'une culture de *B. caryocyanus* en milieu L_1 sont représentés par la Planche I, figures 2, 3, 4.

ALIMENT MINÉRAL

Dans le milieu synthétique L_1 , l'aliment minéral est représenté par 4 électrolytes. Mais les observations faites par LASSEUR et ses Collaborateurs durant ces 20 dernières années ont montré que le phosphore, le magnésium et le fer jouent le plus grand rôle dans la chromogénèse bactérienne. Je me bornerai donc à l'étude de ces trois éléments.

PHOSPHORE.

Depuis les travaux de PASTEUR, les bactériologistes admettent volontiers que le phosphore est indispensable à la vie des Bactéries. Nous ne reviendrions pas sur ce sujet si, d'une part, NICOLLE et ZIA BEY (1916) n'avaient pas constaté la multiplication de *B. pyocyaneus* et la production de pigment en l'absence de phosphore, et si, d'autre part, GESSARD n'avait pas mis en lumière l'extraordinaire sensibilité de *B. pyocyaneus* aux phosphates de potassium, sensibilité contestée il est vrai par K. THUMM (1895).

D'ailleurs les faits observés par LASSEUR (1911) paraissent peu favorables à la thèse soutenue par GESSARD et NICOLLE. De plus, J.-G. MARCHAL (1932) a montré que toutes les souches de *B. pyocyaneus* expérimentées exigeaient un minimum de 10 mmgr. % de phosphate bipotassique pour présenter une végétation régulière. Seule la variété *melanogenes* nécessiterait une dose de phosphate dix fois plus forte.

En présence de telles contradictions, nous avons cultivé *B. caryocyanus* en liquide L_1 renfermant des quantités de phosphate variant de 0 à 500 milligrammes.

En l'absence de tout apport de phosphore, *B. caryocyanus* ne se développe pas. Le milieu de culture reste rigoureusement limpide et incolore.

Cette constatation est conforme aux faits signalés par LASSEUR (1911).

Ainsi que le faisait justement remarquer PASTEUR, les Bactéries ne peuvent donc pas se développer en l'absence de phosphore (1).

(1) On s'est évidemment assuré par des expériences de contrôle qu'il est possible de substituer au phosphate de potasse une source convenable de phosphore et qu'inversement les carbonates, sulfates, nitrates, chlorures de potasse ne peuvent pas remplacer le phosphate de potasse.

Voyons maintenant comment les choses se passent lorsque la teneur en phosphate varie de 1 à 500 milligrammes pour 100 cm³ de liquide nutritif.

Si l'on considère des concentrations faibles, mais déjà sensibles, on constate qu'un teneur de 2,5 milligrammes de phosphate dipotassique pour 100 cm³ de milieu est incapable d'assurer un développement appréciable de *B. caryocyaneus*. A la dose de 10 milligrammes, la végétation est irrégulière, et les cultures sont tantôt incolores, tantôt très légèrement fluorescentes. Par contre une concentration de 50 milligrammes suffit à provoquer l'apparition d'une belle fluorescence verte dont l'intensité est supérieure à celle que l'on observe avec les milieux renfermant 500 milligrammes de phosphate dipotassique.

Il est à noter qu'à la dose de 50 milligrammes seule la fluorescence verte apparaît, tout au plus perçoit-on un léger anneau noir, mais dans aucun cas, on n'observe la production du pigment violet.

En résumé, dès que la quantité de phosphate est suffisante pour assurer une végétation normale du germe, la fluorescence se manifeste, et c'est donc plutôt indirectement que le phosphore intervient dans la fonction fluorescente de *B. caryocyaneus* (1).

MAGNÉSIUM.

GESSARD (1892) estime que la suppression du sulfate de magnésie ne modifie pas sensiblement l'aspect des cultures. K. THUMM (1895) est d'avis opposé. L'observation faite sur *B. chlororaphis* (LASSEUR, 1911) semble montrer que cette contradiction est plus apparente que réelle. Pour résoudre cette question, j'ai, en collaboration avec LASSEUR, G. THIERY et M. OLIVIER, cultivé *B. caryocyaneus* dans les liquides suivants :

1° milieu L₁ normal, c'est-à-dire renfermant du sulfate de magnésium.

2° milieu L₁ dépourvu de sel de magnésium.

3° milieu L₁ dépourvu de sulfate de magnésium mais avec apport tardif ultérieur de magnésium dans la culture.

(1) Avec les peptones les résultats paraissent un peu différents. Les solutions de peptone BYLA et CHAPOTEAUT ne présentent pas de fluorescence nette si elles ne sont pas additionnées de phosphate, tandis qu'elles offrent une belle fluorescence verte lorsque l'on ajoute 100 milligrammes de phosphate de soude à 100 cm³ de solution de peptone. Mais tout le monde sait combien varie la composition des peptones et nous ne croyons pas devoir faire état des essais effectués dans un milieu aussi peu défini. Nos tentatives sont surtout destinées à laisser des points de repère au chercheur qui désirerait reprendre les travaux de GESSARD et les nôtres.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant :

TABLEAU XIII

AGE des cultures	ASPECT DES CULTURES	
	En milieu synthétique L ₁ renfermant 500 mmgr. de sulfate de magnésium pour 100 cm ³ de liquide.	En milieu synthétique L ₁ dépourvu de sulfate de magnésium.
48 h.	Fluorescence verte.	Incolore.
20 j.	Coloration bleue intense, pigment violet rouge par transparence, voile grisâ- tre bordé de noir.	Incolore, pellicule blanche.

Première approximation. — En l'absence de sulfate de magnésium, la fonction fluorescigène ne peut pas se manifester. Voyons maintenant si un apport tardif de sulfate de magnésium peut faire apparaître la fluorescence dans les cultures incolores.

Apport tardif de sulfate de magnésium.

A des séries de cultures effectuées en l'absence de magnésium, donc incolores, et âgées de 8 jours, j'ai ajouté aseptiquement des quantités de sulfate de magnésium variant de 100 à 600 milligrammes pour 100 cm³ de milieu. Les cultures ayant reçu des doses comprises entre 300 et 600 milligrammes présentaient au bout de 24 heures une belle fluorescence verte, la coloration était limitée à la partie superficielle (1) du liquide. Pour les doses de 100 à 200 milligrammes on n'observait aucune coloration après 24 heures de contact. Il ne s'agissait là que d'un retard dans la coloration, car après un nouveau délai de 24 heures, toutes les cultures offraient une fluorescence jaune-vert.

Deuxième approximation. — Il ressort de ces premiers essais que le sulfate de magnésium est indispensable à la manifestation de la fonction fluorescigène.

Cette action de l'électrolyte, doit-elle être attribuée à l'anion ou au cation ?

Afin de répondre à cette question, j'ai essayé de remplacer le sulfate de magnésium par le chlorure de magnésium. Il résulte de ces essais que pour des doses de 100 à 500 milligrammes de chlorure de magnésium on observe sensiblement la même fluorescence qu'avec le sulfate de magnésium.

(1) Couche de 2 à 4 millimètres d'épaisseur.

Ce qui semble bien démontrer que le sulfate de magnésium agit par son cation et non par son anion.

Troisième approximation. — Voyons maintenant s'il est possible de préciser le mécanisme d'action du magnésium dans la fluorescence des cultures de *B. caryocyaneus*.

Pour cela, rappelons tout d'abord l'observation faite par LASSEUR et ses Collaborateurs (G. THIRY, BROQUIN-LACOMBE, NEPVEUX, PALGEN).

On cultive un germe chromogène en milieu synthétique L_1 ne renfermant qu'une très petite quantité de fer (1). Dans ces conditions, on n'observe pas la coloration caractéristique développée par le germe en milieu complet, tout au plus, perçoit-on une très légère coloration jaune ou rose à peine sensible.

Si à de telles cultures, on ajoute une dose convenable de sulfate ferreux, on voit apparaître instantanément la coloration caractéristique du germe étudié. On peut donc espérer arriver à des résultats analogues avec le magnésium. Cette conception est d'ailleurs en harmonie avec ce que l'on sait de la luminescence. Je reviendrai sur ce point ultérieurement. Cultivons maintenant *B. caryocyaneus* en milieu L_1 dépourvu de sulfate de magnésium, mais additionné de doses de chlorure de magnésium variant de 1 à 2.000 milligrammes pour 100 cm³ de milieu. Dans ces conditions d'expérience, on constate l'existence d'une zone de concentration particulièrement favorable à la manifestation de la fluorescence verte, c'est la zone comprise entre 80 et 120 milligrammes (2). Lorsque la quantité de chlorure de magnésium croît, la coloration verte est remplacée par une coloration bleu-vert ou bleue. Au-dessous de 80 milligrammes et jusqu'à 10 milligrammes les cultures présentent une teinte variant du vert pâle au gris-bleu. Enfin, et c'est là le point important, avec des milieux renfermant de 1 à 2 milligrammes de chlorure de magnésium, les cultures ne présentent qu'une coloration jaune-orangé non fluorescente.

C'est dans de telles cultures que j'ai essayé de faire apparaître la fluorescence instantanément (ou du moins en quelques minutes) par l'apport de cations convenables. A cet effet, du milieu synthétique L_1 dépourvu de sulfate de magnésium mais dans lequel on a ajouté de 1 à 2 milligrammes de chlorure de magnésium, estensemencé avec *B. caryocyaneus*. Dans ces conditions de culture et au bout de 4 à 5 jours à la température du laboratoire, on observe la formation d'un voile cohérent surmontant une colonne de liquide trouble dans sa partie supérieure et légèrement colorée en jaune-

(1) De l'ordre du 1/10 ou du 1/100 de milligramme.

(2) Pour le sulfate de magnésium la dose la plus favorable à la fluorescence verte paraît être voisine de 500 milligrammes pour 100 cm³ de milieu.

orangé. A ces cultures, on ajoute 1 à 2 gouttes d'une solution à 8 o/oo de sulfate ou de chlorure de magnésium. Lorsqu'on dépose les gouttes sur le voile il y a formation d'une poche faisant hernie dans le liquide. La diffusion de l'électrolyte dans ce cas est lente et la fluorescence exige plusieurs minutes pour se manifester. Si l'on brise le voile, la fluorescence est instantanée. On facilite la coloration par une agitation ménagée, suffisante pour assurer la diffusion de l'électrolyte dans la couche superficielle de la culture, mais incapable d'amener un brassage de toute la masse liquide.

Dans tous les cas, l'électrolyte doit être déposé à la surface du liquide, car la substance qui devient fluorescente sous l'action du magnésium apporté se localise dans la partie superficielle.

Ces essais ont été effectués avec des cultures en tubes (1). J'ai fait un grand nombre de séries et les résultats ont toujours été concordants, ils s'inscrivent tous dans le même sens.

TABLEAU XIV

Cultures effectuées en milieu L₁ dépourvu de sulfate de magnésium mais renfermant de 1 à 2 milligrammes de chlorure de magnésium (2).

COLORATION des cultures avant addition de Mg	AGE des cultures	ELECTROLYTE ajouté	COLORATION OBSERVÉE après addition de Mg.
Orangé jaune	8 jours	Mg SO ⁴ (3)	Fluorescence verte instantanée
Jaune	4 jours	»	Fluorescence verte intense instantanée
Jaune	8 jours	»	Fluorescence verte intense instantanée
Jaune	4 jours	Mg Cl ²	Fluorescence verte immédiate
Jaune	5 jours	»	Fluorescence verte immédiate
Jaune	8 jours	»	Fluorescence verte immédiate

(1) J'insiste sur ce point. L'histoire des Bactéries chromogènes montre que l'on ne peut pas toujours remplacer les tubes par des ballons de même verre (LASSEUR, 1913).

(2) Au premier abord, des quantités de 1 à 2 milligrammes de chlorure de magnésium peuvent paraître bien trop faibles et on peut craindre qu'elles ne suffisent à assurer la production de la substance mère fluorescente que grâce à l'apport, lors de l'ensemencement, de quantités notables de magnésium. Il n'en est rien, car on obtient la coloration jaune caractéristique même après 3 et 4 passages sur milieu ne renfermant que 1 à 2 milligrammes de chlorure de magnésium.

(3) Pour des raisons de simplification typographique, je ne fais pas figurer dans ce tableau ni dans les tableaux suivants le nombre de molécules d'eau.

L'examen du tableau montre que l'addition de magnésium détermine l'apparition instantanée ou presque instantanée d'une fluorescence verte.

Pour interpréter les résultats obtenus, nous rappellerons que le Bacille cultivé en l'absence de magnésium donne des cultures incolores. En présence de quelques milligrammes de chlorure de magnésium, on obtient une coloration jaune ou orangée et enfin, par addition d'une quantité convenable de magnésium à ces cultures, on détermine l'apparition d'une fluorescence verte.

Il semble donc que l'on observe avec la fluorescence des phénomènes absolument comparables à ceux que nous avons décrits dans l'action du fer sur la chromogénèse des Bactéries (1). En présence d'une très faible quantité de magnésium, il y aurait production d'une substance peu colorée jaune non fluorescente (dans les conditions habituelles d'observation) mais virant au vert et présentant une fluorescence intense sous l'action d'une quantité convenable d'ions Mg^{++} (2).

Si le rôle du magnésium dans la fluorescence est définitivement établi, le mécanisme d'action reste à préciser.

« *En bioluminescence, nous sommes réduits à des généralités vagues où les noms mis sur les corps en réaction ne masquent guère que notre ignorance.* » (A. GUNTZ, 1925, p. 2).

Cependant, le Biologiste ne peut espérer trouver une explication des phénomènes biologiques qu'en cherchant des analogies entre les phénomènes observés et ceux étudiés par les chimistes. Ce qui nous conduit à essayer l'action de différents cations considérés comme phosphorogènes ou comme favorables à la luminescence. A cet effet, des cultures effectuées en milieu L_1 ne renfermant que 1 à 2 milligrammes de chlorure de magnésium, par conséquent colorées en jaune, ont été additionnées de solutions de sels de zinc, manganèse, cuivre, bismuth, chrome, nickel, uranium. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant :

(1) Je renvoie le lecteur aux différentes publications du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy.

(2) Mais pour obtenir des réactions intenses, il est bon d'utiliser des quantités déterminées de magnésium et d'opérer sur des cultures d'âge convenable, en général de 5 à 10 jours, car avec les cultures âgées on n'observe pas de coloration ou tout au plus une faible coloration verte.

TABLEAU XV

Cultures jaunes ou orangées
effectuées en milieu L₁ dépourvu de sulfate de magnésium,
mais renfermant 1 à 2 milligrammes de chlorure de magnésium.

AGE	ELECTROLYTES		INTENSITÉ
des cultures	ajoutés	RÉSULTATS	de la fluorescence exprimée en unités arbitraires
—	—	—	—
4 j.	Mg SO ⁴	fluorescence	8
8 j.	»	fluorescence	7
4 j.	Mg Cl ²	fluorescence	7
8 j.	»	fluorescence	6
4 j.	Zn SO ⁴	fluorescence	20
5 j.	»	fluorescence	19
8 j.	»	fluorescence	18
5 j.	Mn Cl ²	fluorescence	2
4 j., 5 j., 8 j. 10 j.	Ur (CH ³ COO) ²	fluorescence irrégulière	0 à 1
4 j. à 10 j.	Bi (NO ³) ²	pas de fluorescence	0
4 j. à 10 j.	Cr Cl ³	pas de fluorescence	0
4 j. à 10 j.	Ni SO ⁴	pas de fluorescence	0

Remarque. — La solution de sulfate de cuivre à 10 0/00 donne en milieu synthétique L₁ nonensemencé une coloration bleue et de ce fait, il nous a été impossible de faire porter nos recherches sur ce métal bien que le cuivre soit considéré par A. GUNTZ comme un phosphorogène très actif.

L'examen du tableau ci-dessus montre que *B. caryocyaneus* donne naissance à une substance jaune qui sous l'action du zinc, du magnésium ou du manganèse se transforme en un colorant vert fluorescent.

Il est à remarquer que certains métaux considérés comme luminogènes (tel le bismuth) sont sans action sur la fluorescence des cultures bactériennes.

L'aspect du phénomène, que nous venons de décrire, est celui que l'on observe le plus généralement. Mais *B. caryocyaneus* cultivé sur milieu ne renfermant que des traces de chlorure de magnésium (1 à 2 milligrammes)

peut donner naissance (1) dans 10 à 15 % des cas à des cultures incolores ou légèrement bleutées. L'addition de zinc, magnésium ou manganèse à de telles cultures détermine encore l'apparition d'une fluorescence verte.

Température.

On sait que les pigments bactériens sont en général très sensibles à l'élévation de température, ce qui nous a conduit à essayer l'apport de zinc et de magnésium dans des cultures jaunes portées 5' à 100° C. Dans ces conditions d'expérience on ne perçoit pas de formation de substance fluorescente.

Oxygène.

La fluorescence apparaissant (2) dans la couche supérieure de la colonne de liquide, nous avons cherché si l'addition de métaux luminogènes pouvait être faite en l'absence d'oxygène, dans une atmosphère d'azote. Il résulte de ces essais que la coloration verte fluorescente se manifeste aussi bien en absence qu'en présence d'oxygène.

Substitution de chlorure ou sulfate de sodium et chlorure de lithium au sulfate de magnésium dans le milieu synthétique L₁

Lorsqu'on cultive *B. caryocyanus* en milieu L₁ dans lequel on a remplacé le sulfate de magnésium par des quantités importantes (0,5, à 0,7 %) de chlorure de sodium, de sulfate de sodium (3), on obtient là encore des cultures à peine colorées en jaune qui sous l'apport ultérieur de zinc ou de magnésium donnent une fluorescence verte.

Loi de l'optimum.

Quand on étudie systématiquement le phénomène de dilution, on constate que les cultures présentent un optimum de fluorescence. La concentration la plus favorable à la manifestation de la fluorescence varie avec le métal considéré. C'est ainsi que pour le magnésium, la réaction présente son maximum de netteté quand on ajoute 1/20 de cm³ d'une solution à 8 0/00 de sulfate ou de chlorure de magnésium à un tube de culture renfermant 6 cm³ de milieu distribué sur une hauteur d'environ 4 cm. 5.

(1) Au premier passage sur ce milieu par suite de l'apport de quantités notables de magnésium avec la semence.

(2) En milieu L₁.

(3) Ce qui s'explique probablement par les traces de magnésium que renferment les sels de sodium.

Une difficulté.

Nous pouvons donc produire à volonté la fluorescence des cultures de *B. caryocyanus*, mais il est à remarquer que toutes nos observations ne sont valables qu'à la condition de cultiver le germe dans des *tubes* de milieu synthétique et non dans des *ballons* de milieu synthétique, bien que nous ayons affaire dans les deux cas à des vases de même verre (Pyrex-Sibor). Nous retrouvons donc là un phénomène analogue à celui que LASSEUR a observé avec *B. chlororaphis*. Les substances-mères des chromogènes bactériens sont très instables, elles sont détruites rapidement par l'oxydation, réalisée en couche mince dans les cultures en ballons, alors que dans les tubes, l'accès de l'air ne peut s'effectuer que sur une très faible surface.

Emploi du verre au nickel de Wood.

Nous avons pensé qu'il nous serait possible à l'aide de la lumière ultra-violette de déceler la fluorescence dans des cas où elle passait inaperçue pour les conditions habituelles d'observation. A cet effet, nous avons employé l'arc électrique et le verre au nickel. Ce verre « *est pratiquement opaque à la lumière visible, sauf dans une petite région à la limite du spectre, vers le rouge (0 μ 75); il est transparent à l'ultra-violet moyen de 0 μ 39 à 0 μ 33* » (A.-A. GUNTZ).

Nous n'avons pas retiré de la lumière ultra-violette tout le bénéfice que nous étions en droit d'en attendre et cela s'explique par ce fait que le milieu synthétique L₁, non ensemencé, examiné à l'aide de cet écran, présente déjà une belle fluorescence bleu-azur.

Interprétation des résultats.

Depuis l'observation de SCHOENBEIN (1864) et surtout depuis les travaux de GESSARD (1892) on connaît l'action des alcalis et des acides sur la fluorescence des cultures bactériennes. On peut donc se demander si l'apparition soudaine de la fluorescence provoquée par un apport de certains sels n'est pas due à une variation de la concentration en ions H⁺. L'expérience prouve qu'il n'en est rien.

On pourrait peut-être trouver une explication du phénomène en faisant intervenir la théorie photoélectrique de la luminescence [LENARD (1904-1912), SAM SEALAND (1909), A.-A. GUNTZ (1925-1926)] mais l'état actuel de l'expérimentation ne permet pas une telle extrapolation. D'ailleurs, contrairement à ce que Jean et Francis PERRIN (1929) ont observé dans l'« *induction forcée* » l'addition d'iodure de potassium, de sulfocyanure

de potassium, de sulfocyanure d'ammonium ne modifie pas sensiblement la fluorescence des cultures bactériennes.

Il faut donc attendre de nouveaux faits pour tenter une généralisation.

FER.

RAULIN semble être le premier auteur qui ait attiré l'attention des biologistes sur le rôle du fer dans le développement des microorganismes. Depuis cette observation de nombreux travaux ont établi l'influence du fer sur la végétation et le pouvoir chromogène des Bactéries. C'est ce qui ressort notamment des recherches de LASSEUR (1911), LASSEUR et THIRY (1911), BROQUIN-LACOMBE (1913), NEPVEUX (1920), LASSEUR et VERNIER (1924), PALGEN (1925), LASSEUR, THIRY et DUPAIX (1930), LASSEUR, COMBE et DUPAIX (1931).

On sait que c'est en étudiant la production de la chlororaphine que LASSEUR fut amené à préciser le rôle du fer dans la production des pigments bactériens. Et à ce propos je rappellerai l'idée qui guida LASSEUR dans ses recherches. Dans les milieux usuels la production de la chlororaphine est inconstante. Didier SIMON avait observé lui aussi une grande irrégularité dans la fonction chromogène de *B. syncyaneus*. Ce dernier point avait été signalé à LASSEUR par M. le Professeur PETIT. Ces faits conduisirent LASSEUR à rechercher si la formation de cristaux verts n'était pas sous la dépendance de traces d'un métal agissant comme catalyseur. Après avoir soumis tous les produits à une sévère purification, l'auteur réalisa un milieu synthétique permettant une production de cristaux verts abondante et régulière.

La culture de *B. chlororaphis* en milieu dépourvu de fer, l'apport tardif de fer dans ces cultures effectuées en milieu non additionné de fer démontrèrent que « la présence de fer dans les milieux chimiquement définis est indispensable à la production de la chlororaphine » (LASSEUR, 1911, p. 65).

Pour que la chromogénèse puisse se manifester, non seulement il est nécessaire que le milieu renferme du fer, mais encore il faut qu'il existe un certain rapport entre la surface du liquide exposé à l'air et la hauteur de la colonne du liquide (LASSEUR, 1913).

La présence du fer a permis à LASSEUR et THIRY (1911) d'obtenir de belles colorations dans les cultures des Bactéries du groupe *subtilis-mesentericus-megatherium* considérées jusqu'alors comme achromogènes.

En présence de quantités de fer extrêmement faibles (de l'ordre du dixième de milligramme pour 100 cm³ de liquide), *B. subtilis*, *B. mesentericus*, *B. megatherium* donnent des cultures incolores ou légèrement jau-

nâtres dont on peut extraire une substance colorée en jaune donnant en présence des sels de fer une coloration intense variant du rouge au bleu en passant par le vert, le violet-rouge, le violet-bleu (LASSEUR et THIRY).

Nous retrouvons cette action spécifique du fer dans les belles recherches de NEPVEUX (1920) (1). Enfin *B. Le Monnier* ne donne son pigment caractéristique qu'en présence de fer (LASSEUR et VERNIER, 1924). Les travaux de BROQUIN-LACOMBE (1913) (2) et PALGEN (1925) (3) confirment l'action du fer dans la production des pigments microbiens.

BORTELS (1927), en cultivant *B. prodigiosus* dans un liquide synthétique à base d'asparagine, constate que cette Bactérie ne produit pas de pigment rouge dans le milieu dépourvu de fer. La végétation est plus abondante en présence de fer (4) qu'en l'absence de ce métal.

INFLUENCE DU FER SUR LA VÉGÉTATION ET LE POUVOIR CHROMOGÈNE DE *B. caryocyaneus*.

En milieu L₁ non additionné de fer, *B. caryocyaneus* offre d'abord un développement plus faible qu'en milieu L₁ complet, c'est ainsi que le voile est remplacé par une légère pellicule, la fluorescence est bleuâtre. Avec l'âge les cultures peuvent présenter une légère coloration bleu-azur (Pl. I, fig. 5, p. 103); mais jamais on n'observe la coloration bleu-violet ou violet-rouge caractéristique de *B. caryocyaneus*. C'est ce qui ressort de l'examen du schéma ci-dessous :

TABLEAU XVI

Culture de B. caryocyaneus en milieu dépourvu de fer

Culture de 24 heures : développement plus faible qu'en milieu normal, légère pellicule.

Culture de 48 heures : pellicule ; légère fluorescence bleuâtre en surface.

Culture de 15 jours : voile blanchâtre ; coloration bleu-azur ou vert-bleu très faible du liquide de culture.

Si on effectue une série de passages sur des milieux dépourvus de fer, on constate une atténuation des colorations bleuâtres observées la première

(1) (2) et (3) Travaux effectués sous la direction de M. le Professeur LASSEUR.

(4) De même O. METZ (1930) reconnaît que le fer joue un rôle intéressant dans la production des pigments de différents Ascomycètes, mais que son influence n'est pas aussi prépondérante que celle du zinc en ce qui concerne le développement du mycelium et des spores.

fois et dans aucun cas, même en faisant porter les essais sur une centaine de tubes, on n'observe les colorations bleu-violet, violet-rouge spécifiques et le noircissement du voile.

Apport tardif de fer

Lorsqu'on effectue des apports aseptiques de sulfate ferreux dans des cultures d'âge convenable, réalisées en milieu dépourvu de fer, on constate l'apparition des colorations bleu-violet puis violet-rouge et enfin le noircissement du voile. Ce qui démontre d'une façon irréfutable le rôle du fer dans la production du pigment bleu-violet et violet-rouge et le noircissement ultérieur des cultures.

Pour obtenir des colorations franches, il ne faut pas ajouter des quantités quelconques de sulfate ferreux, sinon l'addition du fer détermine, au contact de la substance fluorescente, une coloration brune qui masque l'apparition du pigment bleu-violet.

Les quantités les plus favorables à l'apparition du pigment violet sont celles qu'on réalise en ajoutant :

0 cm³ 1 de solution de sulfate ferreux au 1/10.000 à une culture occupant un volume de 10 cm³, ou 0 cm³ 1 de solution de sulfate ferreux au 1/100.000 à une culture occupant un volume de 10 cm³.

Cette dernière concentration donne les aspects se rapprochant le plus des colorations observées dans le milieu L₁ complet.

Substitution au fer du manganèse, du nickel et du chrome

Nous avons essayé de substituer au fer le manganèse, le nickel et le chrome. Pensant que ces métaux pouvaient présenter une concentration optimum, nous avons fait varier les concentrations d'électrolytes expérimentés. Les sels employés ont été le chlorure de manganèse, le sulfate de nickel et l'acétate de chrome.

Avec le manganèse et le nickel, on obtient la production du pigment fluorescent vert, mais jamais la production de la matière colorante bleu-violet ou violet-rouge, pas plus d'ailleurs que le noircissement des cultures. Le manganèse paraîtrait cependant plus favorable que le nickel à la chromogénèse. En effet, la fluorescence apparaît après vingt-quatre heures de culture dans les milieux renfermant du manganèse, tandis qu'elle ne se manifeste que le troisième jour dans les milieux contenant du nickel.

Avec le chrome, on observe un retard beaucoup plus prononcé, ce n'est

que le dixième ou onzième jour que l'on peut noter une légère coloration verte de la masse liquide.

Il résulte de ces expériences que l'apparition de la teinte violette et le noircissement du voile sont sous la dépendance du fer dans le milieu de culture.

MÉCANISME D'ACTION DU FER

Historique

Pour RAULIN (1870), le fer intervient en empêchant la production d'une substance nocive (acide sulfocyanique). Or, SAUTON a montré que la « *suppression simultanée du fer et du zinc entraîne l'absence dans le milieu de culture* » de la dite substance. Elle ne se produit qu'en présence de zinc, ne fût-il qu'à l'état de traces extrêmement faibles. Et SAUTON (1910) explique l'action du fer en lui faisant jouer le rôle de porteur d'oxygène dans le liquide de RAULIN. C'est à une conclusion analogue qu'arrive BORTELS (1927) lorsqu'il considère le pigment rouge de *B. prodigiosus* comme le résultat de l'oxydation d'un corps coloré, le fer étant l'agent de cette oxydation, qui ne peut se produire que par l'oxydation d'un sel ferreux en solution alcaline.

Probablement sous l'influence des idées ayant cours en physiologie humaine ou végétale à cette époque, LINOSSIER (1889-1890-1891) a pensé que le fer entre dans la composition du pigment des spores de l'*Aspergillus niger*. Quelle que soit la valeur de cette hypothèse pour expliquer le rôle du fer dans la sporulation, cette généralisation ne saurait être invoquée pour expliquer le rôle du fer dans la production de la prodigiosine. En effet, F. WREDE et O. HETTICHE (1929), en établissant la formule de constitution de la prodigiosine, ont montré que ce pigment ne renferme pas de fer. D'ailleurs, en 1911, LASSEUR estimait déjà que le rôle du fer dans la coloration des cultures ne pouvait pas se ramener à un schéma trop simplifié. La chlororaphine, produit cristallisé dont la purification peut être poussée aussi loin que l'on désire, ne renferme pas de fer; c'est ce que confirment les belles découvertes de KÖGL et POSTOWSKY (1930 (1)). Dans la production de la chlororaphine, le fer peut être considéré comme un porteur d'oxygène, puisque l'oxygène et le fer doivent être simultanément présents dans le milieu de culture pour assurer la formation des cristaux verts.

Mais le rôle du fer paraît beaucoup plus compliqué dans de nombreux

(1) Sur la constitution de la chlororaphine.

cas ; ainsi un grand nombre de Bactéries, en milieu synthétique L₁, donnent tout d'abord des cultures très fluorescentes. Puis à cette coloration fait suite peu à peu une teinte rosâtre, brune, coloration qui est due à l'action des sels de fer sur le pigment fluorescent (LASSEUR, 1911). Avec d'autres Bactéries, le rôle du fer est encore plus complexe.

C'est ce que l'on observe, en effet, avec le Bacille étudié par NEPVEUX. Ce germe, cultivé en présence d'une quantité extrêmement faible de fer (de l'ordre du 1/10 de milligramme pour 100 centimètres cubes de liquide), donne des cultures incolores ou légèrement jaunâtres. Or, si, à des cultures d'âge convenable, on ajoute des quantités déterminées de sulfate ferreux, on voit apparaître une coloration violette intense.

Mais il y a plus. La présence de traces de fer exalte la production de la substance-mère du corps coloré. Dans cet exemple, le rôle du fer ne peut donc pas être ramené à une action catalytique. Il en est de même pour toutes les colorations observées dans les cultures des Bactéries du groupe *subtilis*, *mensentericus*, *megatherium*, cultivées en milieu synthétique L₁.

Résumé

Si nous essayons de résumer les faits connus jusqu'ici, nous dirons que le fer est un vecteur possible d'oxygène (au sens de WOLF) dans les expériences de RAULIN (1870), SAUTON (1910), LASSEUR (1911), LASSEUR et VERNIER (1924), BORTELS (1927), LASSEUR, THIRY et DUPAIX (1930), LASSEUR, COMBE et DUPAIX (1931). Mais le rôle du fer ne peut pas toujours être ramené à un schéma aussi simplifié. Excitant la végétation, la croissance bactérienne, stimulant la chromogénèse, dominant même parfois la production des pigments (chlororaphine, prodigiosine) (sans entrer dans leur constitution), le fer est un modificateur profond du métabolisme microbien.

L'ordre de grandeur des concentrations actives fait songer aux actions catalytiques. C'est bien la seule hypothèse qui soit susceptible de quelque généralisation, car le fer n'intervient dans la constitution du pigment que dans un nombre de cas extrêmement restreint (NEPVEUX, LASSEUR et THIRY, BEIJERINCK).

ALIMENT HYDROCARBONÉ

Dans le milieu synthétique L₁, l'aliment hydrocarboné est représenté par la glycérine. En milieu non additionné de glycérine, la végétation de *B. caryocyanus* est plus faible qu'en milieu complet, en effet, tandis

qu'après quatre jours de culture le milieu normal présente un voile épais, la culture effectuée en l'absence de glycérine ne montre qu'une fine pelli-cule.

Nous venons de voir l'action de la glycérine sur la multiplication de *B. caryocyaneus*. Examinons maintenant le rôle de cet hydrate de carbone sur la fonction chromogène du germe isolé par BEIJERINCK.

En milieu L₁ dépourvu de glycérine, on note une belle fluorescence verte du liquide nutritif. Cette coloration persiste jusque vers le seizième jour de culture. A partir de ce moment, la coloration verte s'atténue et après vingt-quatre jours de culture le liquide présente une teinte très faiblement jaunâtre. A aucun stade du développement de la culture, on n'observe le pigment bleu-violet caractéristique de *B. caryocyaneus*.

La glycérine paraît donc indispensable à la production de la caryocyanine et à une végétation active.

BIBLIOGRAPHIE

PHOSPHORE

BRAUN (H.) et MUNDEL. — *Centrabl. f. Bakt. Parasit. u. Infect.*, Abt. I, Orig., Bd. 112, p. 347-354, 1929.

DUCLAUX (E.). — *Traité de Microbiologie*, T. III. Fermentation alcoolique. Paris, Masson, 1900.

GESSARD (M.-C.). — *Ann. Inst. Past.*, p. 801-823, T. VI, 1892.

JIROU (J.). — *Journ. de Physiol. et de Pathol. gén.*, T. III, p. 188-199, 1901.

LASSEUR (Ph.). — *Thèse doctorat sciences*, Nancy, Berger-Levrault, 147 pages, 1911.

LASSEUR (Ph.), THIRY (G.), DUPAIX (A.) et OLIVIER (M.). — *Trav. Labor. Microb.*, fasc. III, p. 33, 1930.

LEPIERRE (Ch.). — *Ann. Inst. Past.*, p. 643-663, t. VIII, 1895.

NICOLLE (M.) et ZIA BEY. — *Ann. Inst. Past.*, T. X, p. 669, 1896.

RAULIN (J.). — *Thèse doctorat Sciences physiques*, Paris, Masson, 216 pages, 1870. Nouvelle édition conf. à l'orig., 1905.

THUMM (K.). — *Arbeiten aus dem bact. Inst. der techn. Hochschule zu Karlsruhe*. Emmendingen Druck von A. Dölter, 89 pages, 1895.

WOLFF (H.). — *Biochem. Zeitschr.*, Bd. 158, 4/6, p. 319-333, 1925.

MAGNÉSIUM

BORTELS (H.). — *Biochem. Zeitschr.*, Bd. 182, 5/6, p. 301-358, 1927.

BRAUN (H.). — *Natur und Museum*, Heft 9, p. 413-423, 1927.

BRAUN (H.) et GOLDSCHMIDT (R.). — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Orig., Bd. 101, 6/7, p. 330-336, 1927; Bd. 107, p. 329, 1928; Bd. 109, p. 272, 1928.

BRAUN (H.) et LISCH (H.), HEUKEL (H.), GINTSCHEFF (P.). — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Orig., Bd. 107, p. 35, 1928.

- BRAUN (H.) et MUNDEL (F.). — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Orig., Bd. 112, p. 347-354, 1929.
- BRAUN (H.), HOFMEIER (K.) et MUNDEL (F.). — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Orig., Bd. 113, p. 531, 1929.
- DUCLAUX (E.). — *Traité de Microbiologie*, T. I, Microbiologie générale. Nutrition minérale des microbes, p. 176, 1898.
- LASSEUR (Ph.). — *Thèse doctorat Sciences*, Nancy, Berger-Levrault, 1911.
- LASSEUR (Ph.), THIRY (G.), DUPAIX (A.) et OLIVIER (M.). — *Trav. Laborat. Microbiol.*, Fasc. III, p. 33-53, 1930.
- LUDWIG (O.). — *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*, Bd. 16, III, p. 465-510, 1928.
- PALGEN (W.). — *Thèse pharmacie*, Nancy, Camille André, 149 pages, 1925.
- RAULIN (J.). — *Thèse doctorat Sciences physiques*, Paris, Masson, 216 pages, 1870, Nouvelle édition conf. à l'orig., 1905.
- RIPPEL (A.) et BORTELS (H.). — *Biochem. Zeitschr.*, Bd. 184 1/3, p. 237-244, 1927.
- SEIGO KONDO. — *Biochem. Zeitschr.*, Bd. 155, Heft 1/2, p. 148-158, 1925.
- WOLFF (H.). — *Biochem. Zeitschr.*, Bd. 158, 416, p. 319-333, 1925.

FER

- AGULHON (H.). — *Ann. Inst. Past.*, p. 321-329, 1910.
- BECQUEREL (P.). — *Caisse recherches Scientifiques*, p. 34, 1911-1922.
- BEIJERINCK (M.-W.). — *Arch. Neerland. de Physiol. de l'Homme et des Animaux*, T. II, p. 609-615, 1918.
- BERTRAND (G.). — *C. R. Acad. Sciences*, T. CLIV, p. 381, 1912.
- BORTELS (H.). — *Biochem. Zeitschr.*, Bd. 182, 5/6, p. 301-358, 1927.
- BRAUN (H.). — *Natur und Museum*, Heft 9, p. 413-423, 1927.
- BROQUIN-LACOMBE (A.). — *C. R. Soc. Biol.*, T. I, p. 331-332, 1913; *C. R. Soc. biol.*, T. II, p. 598-600, 1913.
- CALMETTE, MASSOL et BRETON. — *C. R. Soc. biol.*, T. 66, p. 580, 1909.
- CUGINI. — *Justs bot. Jahresber.*, 4, 114, 1876.
- DUCLAUX (E.). — *Traité de Microbiologie*, T. I, Nutrition minérale des microbes, p. 176, 1898.
- ESTOR (W.). — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. II, Bd. 72, p. 411-443, 1927.
- JAVILLIER. — *Ann. Inst. Past.*, T. XXII, p. 720, 1908; *C. R. Acad. Sciences*, T. CLV, p. 193, 1912.
- KUHNE. — Référence : PROSKAUER et BECK. *Revue de la Tuberculose*, II, p. 355, 1894.
- LAPPALAINEN. — *Akadem. Abhand.*, Helsingfors, 1919.
- LASSEUR (Ph.). — *Thèse doctorat Sciences*, Nancy, p. 53-62, 1911; *C. R. Soc. biol.*, T. LXX, p. 154, 1911; *C. R. Soc. biol.*, T. LXXIII, p. 47, 1912.
- LASSEUR (Ph.) et THIRY (G.). — *C. R. Acad. Sciences*, T. 156, p. 166, 1913; *C. R. Soc. biol.*, T. LXXIV, p. 163, 1913.
- LASSEUR (Ph.). — *C. R. Soc. biol.*, T. LXXIV, p. 496, 1913; *Recueil publié à l'occasion du Jubilé scientifique du Professeur G. LE MONNER*, p. 99-114, novembre 1913.

- LASSEUR (Ph.) et VERNIER (P.). — *Bull. Soc. Sciences*, Nancy, Série IV, T. II, fasc. II, p. 69-135, 1924.
- LASSEUR (Ph.), THIRY (G.) et DUPAIX (A.). — *Trav. Laborat. Microbiol.*, Fasc. III, p. 53-66, 1930.
- LINOSSIER (G.). — *Ann. Micrographie*, T. III, p. 359, 1889-1890; *C. R. Acad. Sciences*, T. CXII, p. 489, 1891.
- LUTZ et GUEGEN. — *Bull. Soc. Sciences pharmacol.*, oct. 1900.
- METZ (O.). — *Arch. f. Mikrobiol.*, Bd. I, Heft 2, p. 197. 1930.
- MOLISCH. — *Die Pflanze in ihren Beziehungen zum Eisen*; Jena, 1892.
- NEPVEUX (F.). — *Thèse pharmacie*, Nancy, p. 84-92, 1920.
- PALGEN (W.). — *Thèse pharmacie*, Nancy, p. 32, 1925.
- RAULIN (J.). — *Thèse sciences physiques*, Paris, Masson, 1870. Nouvelle édition de 1905, conf. à l'orig., p. 169-189.
- RIPPEL (A.) et BORTELS (H.). — *Biochem. Zeitschr.*, Bd. 184, 1/3, p. 237-244. 1927.
- SAUTON (B.). — *C. R. Acad. Sciences*, T. CLI, p. 241, 1910.

RELATION ENTRE LE pH DU MILIEU SYNTHETIQUE I,
ET LE POUVOIR CHROMOGÈNE DE *B. caryocyanus*

GÉNÉRALITÉS

L'influence de la réaction des milieux a depuis fort longtemps préoccupé les microbiologistes. Mais ce n'est qu'en 1905 que « *The American Public Health Association* », dans son « meeting » de Chicago, s'est efforcée de standardiser la réaction des milieux de culture. En France, on se contentait de neutraliser les milieux nutritifs en présence de tournesol ou de phénolphthaléine.

Etant données les causes d'erreur que comporte la neutralisation des milieux peptonés en présence de tournesol, on ne doit pas s'étonner si chaque opérateur obtenait des résultats cultureux différents.

V. HENRI (1906) avait bien attiré l'attention des biologistes sur le rôle des ions H⁺, malheureusement l'œuvre de ce savant ne fut pas comprise de ses contemporains, et il faut arriver au symbole de SÖRENSEN, et surtout à la publication du travail de CLARK (1923) : « *The determination of hydrogen ions* » pour voir les biologistes attacher une importance particulière aux nouvelles méthodes d'évaluation des ions hydrogène.

A cette même époque, ABT (1923), dans un remarquable mémoire paru dans la *Revue d'Hygiène*, rappelle le rôle des ions H⁺ dans la culture des Bactéries.

Je sortirais du cadre de ce mémoire en résumant tous les travaux effectués sur le pH en Microbiologie. Je rappellerai seulement que le nombre

des mémoires publiés sur cette question est déjà considérable et que les résultats acquis ne sont certes pas en rapport avec l'effort déployé.

Si l'étude des variations du pH peut rendre des services au microbiologiste, on aurait tort d'en exagérer l'importance. D'ailleurs, pour très intéressants que soient les ions H^+ , ils ne sauraient en aucune façon faire oublier le rôle parfois capital de certains ions tels que Fe^{+++} , Mg^{++} etc... pas plus d'ailleurs que la nature du radical auquel est attaché l'hydrogène dans la molécule acide.

Reconnaissons toutefois que la facilité avec laquelle on détermine les ions H^+ , prédispose plus spécialement à l'étude du pH des milieux de culture.

Nous souvenant de la relation établie par les premiers auteurs (1) entre l'alcalinisation des milieux et la fluorescence des cultures bactériennes, nous avons recherché s'il existait un optimum de fluorescence pour un pH donné.

Ce sont ces tentatives que je vais résumer en distinguant deux parties dans mes recherches :

1° Relation entre le pH du milieu nutritif et le pouvoir chromogène de *B. caryocyaneus*.

2° Variations du pH dans les cultures en fonction de l'âge.

Les mesures du pH ont été effectuées par la méthode électrométrique.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

J'envisagerai tout d'abord l'action du pH sur la fluorescence, puis l'influence du pH sur la production du pigment bleu-violet.

1° Influence du pH du milieu de culture sur la production de la fluorescence.

Les résultats des expériences destinées à établir une relation entre le pH du milieu nutritif et la fluorescence de la culture sont résumés dans le tableau XVII.

(1) SCHOENBEIN, GESSARD, etc.

TABLEAU XVII

pH du milieu synthétique lors de l'ensemencement	Intensité de la fluorescence des cultures exprimée en unités arbitraires après	
	18 heures	48 heures
5,4	0	1-2
6,	0	2-3
7,	0	3-4
7,2	4	10-11
7,6	0	6-7

L'examen des nombres ci-dessus montre que le $\text{pH} = 7,2$ est le plus favorable à la production du pigment vert fluorescent. Dans les milieux de $\text{pH} = 7,4$ et $7,6$, une même quantité de substance fluorescente devrait déterminer une fluorescence plus grande des cultures qu'à $\text{pH} = 7,2$, puisque les ions OH^- exaltent la fluorescence. Or il n'en est rien. Si l'on observe un maximum de fluorescence à $\text{pH} = 7,2$, cela tient donc à ce que cette concentration en ions H^+ est plus favorable à la multiplication bactérienne, que la concentration de $\text{pH} = 7,6$.

En ce qui concerne la végétation, il est à noter que les cultures se développent moins rapidement durant les 18 premières heures à $\text{pH} = 6,6$, $6,8$ et 7 qu'à $\text{pH} = 7,2$. Au bout de 48 heures, les différences commencent à se niveler de $\text{pH} = 6,6$ à $\text{pH} = 7,2$, seuls les milieux offrant des pH variant de $5,4$ à $6,3$ présentent une végétation plus faible que les autres. Après 5 jours, l'intensité de la végétation s'est à peu près unifiée dans toute la série, c'est-à-dire de $\text{pH} = 5,4$ à $\text{pH} = 7,2$.

B. caryocyaneus a donc une zone de croissance assez large; il se développe même plus facilement en milieu légèrement acide qu'en milieu alcalin ($\text{pH} = 7,4-7,6$).

2° Influence du pH du milieu de culture sur la production du pigment bleu-violet.

Lorsqu'on cultive *B. caryocyaneus* en milieu synthétique L_1 de pH croissant de $5,4$ à $7,6$, on constate que la production du pigment bleu et du pigment violet s'observe surtout dans les zones de concentration variant de $\text{pH} = 5,4$ à $\text{pH} = 7$. Mais c'est dans les milieux de $\text{pH} = 6$ que le pigment violet apparaît le premier.

Nous venons de voir que l'acidité des milieux de culture ne détermine

qu'un retard de la croissance bactérienne; pour expliquer ce fait, deux hypothèses peuvent être émises :

1° accoutumance des Bacilles aux ions H^+ .

2° alcalinisation progressive du milieu de culture.

Pour vérifier le bien fondé de ces hypothèses, nous avons effectué les mesures consignées dans le tableau XVIII.

TABLEAU XVIII

AGE DES CULTURES	COLORATION DES CULTURES SUR MILIEU SYNTHÉTIQUE L_1	pH DES CULTURES
10 minutes		7,00
36 h.	verte fluorescente.....	7,75
48 h.	jaune-brun faiblement fluorescente.....	7,91
4 j.	brune, reflets rougeâtres.....	8,30
7 j.	brun noirâtre.....	8,00
10 j.	noire	8,20

Remarque. — Les cultures ont été faites dans des Erlenmeyer contenant chacun 20 centimètres cubes de milieu synthétique L_1 de $pH = 7$.

A mesure que la Bactérie se développe, le milieu devient donc de plus en plus alcalin. L'hydrolyse de l'asparagine avec formation d'ammoniaque par les Bactéries fluorescentes est un fait banal. Et cependant l'alcalinisation des cultures par *B. caryocyanus* nous intéresse vivement. En effet, la perception de la fluorescence n'est pas uniquement sous la dépendance de la réaction du milieu: une culture de $pH = 8,20$ peut se montrer pratiquement dépourvue de fluorescence alors qu'elle présente une belle fluorescence à $pH = 7,75$.

La manifestation de la fluorescence bactérienne est donc sous la dépendance de nombreux facteurs et l'on ne peut plus schématiser comme le faisaient les premiers auteurs en établissant une relation étroite entre la fluorescence des cultures et la réaction du milieu.

BIBLIOGRAPHIE

- AVERY (O.-T.) et CULLEN (G.-E.). — *Journ. of exp. medicine*, vol. 29, p. 215-234, 1919; *Journ. of exp. medicine*, vol. 30, p. 359-378, 1919.
 AYERS (S.-H.), JOHNSON (W.-T.) et DAVIS (B.-J.). — *Journ. of Infect. diseases*, vol. 23, p. 290-300, 1918.

- BOEHM (M.-M.) et KOPACZEWSKI (W.). — *Protoplasma*, T. VI, n° 2, p. 302-320, 1929.
- CLUZET (J.), ROCHAIX (A.) et KOFMAN (Th.). — *C. R. Soc. biol.*, T. LXXXIX, p. 1039-1040, 1923.
- DERNBY (K.-G.) et AVERY (O.-T.). — *Journ. of exp. medicine*, vol. 28, p. 345-357, 1918.
- DERNBY (K.-G.). — *Ann. Inst. Past.*, T. 35, p. 277-290, 1921.
- ITANO (A.) et NEILL (J.). — *Journ. of general physiology*; vol. I, n° 4, p. 421-428, 1919.
- KOPACZEWSKI (W.). — *Traité de Biocolloïdologie*, T. I, fasc. II, p. 350, Gauthier-Villars, 1930; *Archiv. f. Mikrob.*, Bd. II, Feft 2, p. 187-244, 1931.
- LASSEUR (Ph.), OLIVIER (M.), DUPAIX (A.) et MAGUITOT (C.). — *Trav. Laborat. Microbiol.*, fasc. III, p. 67-74, 1930.
- LASSEUR (Ph.), FRIBOURG (R.) et GROJEAN (M.). — *Trav. Laborat. Microbiol.*, fasc. V, p. 125-136, 1932.
- LORD (F.-T.) et NYE (R.-N.). — *Journ. of exp. medicine*, vol. 30, p. 389-399, 1919.
- LORD (F.-T.). — *Journ. of exp. medicine*, vol. 30, p. 379-388, 1919.
- SHERMAN (J.-M.) et HOLM (G.-E.). — *Journ. of Bacteriol.*, vol. VII, n° 5, p. 465-470, 1922.
- WALPOLE (G.-S.). — *Biochem. J.*, v. 207, 1911.
-

CHAPITRE III

ÉTUDE DE LA CARYOCYANINE

Certains lecteurs trouveront peut-être que je résume trop brièvement l'histoire des corps colorés fabriqués par *B. caryocyaneus*. Ils ont pour cela deux excellentes raisons à invoquer : 1° l'importance des pigments dans la diagnose des Bactéries ; 2° le fait de travailler dans un Laboratoire où les pigments firent l'objet de recherches longuement poursuivies par M. le Professeur LASSEUR, recherches auxquelles KÖGL et POSTOWSKY ont rendu un si éloquent hommage en 1930 (in *Justus Liebigs Annalen der Chemie*).

Je répondrai que ce sont justement les admirables recherches de KÖGL et de ses collaborateurs (BECKER, ERXLEBEN, JANECKE, POSTOWSKY, TAEUFENBACH, TÖNNIS, DE VOSS, WIRTH) qui m'ont déterminée à ne pas effectuer une étude approfondie des matières colorantes fabriquées par *B. caryocyaneus*.

KÖGL a établi en effet la formule de constitution de nombreux pigments, il a acquis une telle supériorité dans ce domaine qu'il est infiniment préférable de laisser au célèbre savant hollandais le soin de mener à bien l'étude de la caryocyanine.

Je me bornerai donc à rappeler quelques propriétés des corps colorés fabriqués par *B. caryocyaneus*, propriétés que tout microbiologiste peut contrôler.

Corps colorés fabriqués par *B. caryocyaneus*.

Nombre.

B. caryocyaneus produit une substance fluorescente jaune-verte ou verte, suivant les conditions de culture, c'est la bactérofluorescéine des auteurs, pigment bien souvent cité depuis les belles recherches de THUMM. La production de telles substances est un fait banal qui s'observe chez de nombreuses Bactéries. Il s'en suit qu'elle perd tout intérêt dans la diagnose du germe isolé par BEIJERINCK.

A côté de ce corps coloré fluorescent jaune-vert, *B. caryocyaneus* donne naissance à une autre substance colorée désignée par BEIJERINCK sous le nom de caryocyanine et dont les nuances varient du bleu ciel au noir en passant par le bleu-violet le violet-rouge et le violet-noir.

Siège de la matière colorée

HISTORIQUE

La coloration du lait, des matières amylacées, de la viande, etc., sous l'influence d'un développement microbien, est un fait très anciennement connu. On avait perçu le phénomène et on l'avait décrit bien avant d'en déterminer la cause (exemple de la prodigiosine). Mais la production de corps colorés n'est pas fatalement en relation avec la coloration des plastides bactériennes.

C'est ainsi que BEIJERINCK (1892) divise les Bactéries chromogènes en trois groupes principaux :

1) les Bactéries chromophores, dont la matière colorante fait partie intégrante du corps bactérien. A ce groupe appartiennent les Bactéries sulfurées pourpres, les Bactéries vertes, rouges, jaunes et brunes qui ne liquéfient pas la gélatine ;

2) les Bactéries chromopares ou Bactéries pigmentaires proprement dites « sont caractérisées par le fait que, initialement, le corps bactérien vivant est toujours incolore ; la matière colorante est séparée comme telle ou comme matière chromogène incolore, et on ne doit y voir qu'un produit d'excrétion sans utilité pour l'organisme ». C'est le cas de *B. prodigiosus*, *B. cyaneo-fuscus*, *B. cyanogenus*, *B. pyocyaneus*, *B. virescens* ;

3) les Bactéries parachromophores, dont la matière colorante est manifestement un produit d'excrétion adhérent au corps microbien. Cet exemple rare ne s'observerait qu'avec *B. janthinus*, *B. violaceus*.

La subdivision en Bactéries chromopares et en Bactéries parachromophores ne me paraît pas justifiée, et je donne le nom de Bactéries chromogènes aux Bactéries rangées par BEIJERINCK dans ces deux catégories.

L'étude de la coloration naturelle des plastides bactériennes se heurte à de nombreuses causes d'erreur. Cette coloration peut être très faible, il y a donc lieu d'utiliser une combinaison optique apochromatique.

Il ne faut pas oublier que les faibles dimensions des plastides bactériennes constituent une autre cause d'erreur. Les Bactéries pourpres sont considérées à juste titre comme le type des Bactéries à pigment interne. Or,

WINOGRADSKY (1888, p. 47) lui-même fait remarquer que si *Rhodobacterium capsulatum* et *Rhodobacterium palustre* sont rouge carmin lorsqu'on les observe en grande masse, ils ne paraissent plus que rougeâtres ou incolores lorsqu'on se limite à l'examen d'une seule plastide. De même, dans les expériences de DANGEARD (1890), les éléments isolés d'*Eubacillus* possèdent une très légère teinte verte qui peut passer inaperçue, alors que la coloration est très appréciable quand les corps microbiens sont en grande quantité. Cette remarque est d'ordre général et un élément bactérien ne paraît coloré que si la plastide est suffisamment teintée.

Laissons de côté les Bactéries pourpres imprégnées de bactériopurpurine et jetons un coup d'œil rapide sur les autres Bactéries chromogènes. Nous constatons que les plastides de différentes espèces bactériennes peuvent être colorés d'une façon plus ou moins intense. Chez *B. Le Monnierii* LASSEUR 1912, on observe deux catégories de plastides, les unes relativement peu mobiles, peu colorées, les autres extrêmement mobiles, présentant au centre un gros grain chromatique coloré en bleu foncé. L'examen approfondi des plastides décèle une structure granuleuse avec vacuoles et grains cytoplasmiques colorés en bleu. G. THIRY a observé lui aussi deux sortes de plastides dans les cultures de *B. indigoferus* VOGES 1893 et de *B. polychromogenes* CHAMOT et THIRY 1897. Certaines plastides sont incolores et très mobiles, d'autres éléments plus gros, moins mobiles ou complètement immobiles sont colorés en bleu d'une façon intense.

Lorsqu'on examine une suspension de plastides de *B. prodigiosus* (provenant d'une culture âgée de 48 heures) entre lame et lamelle à un grossissement moyen (1), on constate que l'immense majorité des plastides paraît incolore. Tout au plus observe-t-on çà et là quelques Bactéries très colorées et quelques masses rouges de taille et de forme variables. En reprenant cet examen dans de meilleures conditions d'expérience (microscope binoculaire ZEISS, muni d'un condensateur aplanétique, objectifs apochromatiques 1,5 et 2 mm., oculaire apochromatique K 12,5 X), les plastides montrent des grains rouge rubis ou rouge sombre de grosseurs différentes et en nombre plus ou moins grand. Le nombre des plastides possédant des grains rouges peut atteindre 100 %, mais dans d'autres cultures, ce nombre est beaucoup plus faible (de 10 à 40 % des plastides). Il faut remarquer que les grains rouges de prodigiosine n'apparaissent pas que chez les plastides mortes; ils s'observent aussi dans des éléments indiscutablement vivants et doués d'une grande motilité.

(1) Grossissement d'environ 900 diamètres.

Les plastides d'un grand nombre de formes bactériennes, telles que *B. pyocyaneus*, *B. cyaneo-fluorescens*, *B. chlororaphis* sont pratiquement incolores, bien que les cultures de ces germes puissent offrir les colorations les plus vives et les plus intenses.

Après avoir très brièvement résumé la répartition de la matière colorante dans les cultures de quelques Bactéries chromogènes, je vais maintenant envisager le siège de la caryocyanine.

SIEGE DE LA CARYOCYANINE

Dans les vieilles cultures de *B. caryocyaneus*, l'immense majorité des plastides paraît à peine colorée lorsqu'on effectue l'examen avec une combinaison optique apochromatique (oculaire apochromatique K 12,5 X; objectifs apochromatiques 90 et 120; condensateur aplanétique 1,4). Cependant, quelques éléments paraissent légèrement teintés en brun ou en vert, d'autres plastides montrent des grains colorés en brun ou en vert foncé, nuance qu'il est très difficile de préciser.

Si on examine les corps microbiens, non plus sous une épaisseur de l'ordre du μ , mais sous une épaisseur de plusieurs centimètres (1), on constate que les plastides sont colorés en bleu foncé ou en noir. Il ne s'agit pas d'une précipitation du pigment par centrifugation, car le liquide limpide surnageant les corps microbiens reste coloré en bleu violet; de plus, en le soumettant à la filtration sur bougie L₃, une fraction très importante du pigment traverse la bougie. L'état de dispersion d'une partie au moins du colorant est donc poussée très loin.. Dans les cultures de *B. caryocyaneus*, on peut aussi observer des masses (2) de pigment, amorphes, de taille et de forme très différentes.

Quels que soient la nature et le siège du corps coloré, celui-ci doit nécessairement diffuser à un moment donné hors de l'élément bactérien, ne serait-ce que par peptisation du corps microbien. En raison des petites dimensions des plastides, les suspensions bactériennes offrent une surface active considérable, et lorsqu'elles se trouvent dans un milieu qui renferme une substance colorée, elles peuvent l'adsorber. On conçoit alors que, suivant les conditions d'expérience (âge de la culture, réaction du milieu...),

(1) C'est ce qu'on réalise en centrifugeant assez longtemps une culture sur milieu synthétique L₂ et en soumettant les corps microbiens à des lavages répétés.

(2) Les masses colorées existent aussi dans les cultures de *B. indigoferus* VOGES 1893, *B. polychromogenes* CHAMOT et THIRY 1897, *B. cyaneo-fuscus* BEIJERINCK 1891, etc...

le pigment puisse être distribué primitivement dans toute la masse du cytoplasme ou fixé secondairement par adsorption, soit sur la membrane, soit sur différents points du cytoplasme.

La caryocyanine est-elle un colorant au sens de WITT?

Afin de décider si la caryocyanine est un chromogène ou un colorant au sens de WITT, j'ai cultivé *B. caryocyanus* :

- 1) en présence de différentes fibres ;
- 2) en présence d'*Endomyces albicans*.

Des floches de soie, préalablement stérilisées par passage dans l'alcool-éther, sont placées dans un ballon renfermant du liquide synthétique L₂. Après un certain temps de contact entre la soie et le milieu pour permettre la diffusion des traces d'alcool-éther dans toute la masse liquide, le milieu estensemencé. Dans ces conditions d'expérience, la soie naturelle prend une magnifique coloration bleue, malheureusement difficile (1) à définir. On peut cependant la rapprocher du bleu 417 et du vert bleu 392 ou 397 du Codé des couleurs. La soie artificielle acquiert sensiblement la même coloration.

Les cultures mixtes de *B. caryocyanus* et d'*Endomyces albicans* âgées de cinq jours montrent, à l'examen microscopique, des cellules de Champignon dont la membrane blanche se détache nettement du reste de la cellule colorée en bleu-vert. A l'intérieur du cytoplasme, on perçoit souvent de grosses masses sphériques de nombre et de taille variables. Certaines de ces formations sont entourées d'une zone claire. Chez d'autres cellules, on peut observer, à l'intérieur des vacuoles, des petits grains animés de mouvement brownien, quelquefois les grains, très nombreux, sont disposés tout autour de la grande vacuole.

Extraction de la caryocyanine

Dans les cultures âgées de 48 heures ou de trois jours, en milieu synthétique L₂, on observe un voile noir surmontant une colonne liquide colorée en bleu-violet.

Il est possible, soit par filtration, soit par centrifugation, de séparer

(1) Difficulté que LASSEUR a déjà signalée dans ses essais de teinture de la soie, de la laine et du coton mordancé par différents pigments microbiens.

les corps microbiens du liquide qui contient en dissolution ou en suspension la fluorescéine et la caryocyanine; mais toutes les tentatives faites pour extraire la caryocyanine du liquide coloré sont restées vaines.

Le traitement successif par :

1° acide silicotungstique et ammoniaque (G. BERTRAND, 1889);

2° acide phosphomolybdique et baryte;

3° acide perchlorique;

4° tanin et oxyde de plomb,

ne m'a pas permis d'isoler la caryocyanine; je n'ai pas été plus heureuse avec les deux procédés proposés par LASSEUR : d'une part, l'analyse capillaire (1914), et d'autre part, le sulfate d'ammoniaque et l'acétone (1914).

Les cultures traitées par l'éther sulfurique, l'éther de pétrole, le chloroforme, l'alcool amylique en solution légèrement acide ou légèrement alcaline ne permettent pas d'obtenir de solutions de caryocyanine.

Il en est de même des essais effectués avec la pyridine, dissolvant énergétique des pigments microbiens.

Dans ces essais, les corps microbiens étaient séparés de la culture par filtration ou centrifugation et, après dessiccation, traités par la pyridine (1).

PROPRIÉTÉS DES CULTURES COLORÉES

DE *B. CARYOCYANEUS*

DÉBARRASSÉES DE LEURS CORPS MICROBIENS

Les anciens bactériologistes attachaient une grande importance à l'action des acides et des bases sur les pigments bactériens. J'indique, dans le tableau ci-dessous, les changements de coloration de quelques pigments sous l'influence des acides et des bases.

(1) Procédé que LASSEUR a utilisé pour l'isolement du pigment bleu sécrété par *B. Le Monnier*.

TABLEAU XIX

DÉSIGNATION DES BACTÉRIES	COLORATION DU PIGMENT	COLORATION DES SOLUTIONS DU PIGMENT APRÈS ADDITION DE			
		acide, puis	base	base, puis	acide
<i>M. cyaneus</i> (SCHRÖTTER)	bleu cobalt	rouge → bleu			
<i>M. pseudo-cyaneus</i> (COHN)	bleu bleu-vert	rouge. → bleu			
<i>B. cyanogenus</i>	bleu	bleu → rouge		rouge → bleu	
<i>B. pyocyaneus</i>	bleu	rouge → bleu		bleu → rouge	
<i>B. indigoferus</i>	bleu	bleu → décoloré			
<i>B. polychromogens</i> .. }	bleu	violet ou rouge			violet
	vert	rouge; excès d'acide, décoloré			vert → rouge
<i>B. lacmus</i>	bleu-violet pâle	rose-rouge			bleu

ACTION DES BASES ET DES ACIDES SUR LA CARYOCYANINE

L'addition de quelques gouttes d'ammoniaque ou de potasse à une culture de *B. caryocyaneus* précipite la caryocyanine en faisant apparaître une coloration vert intense de la culture. Si on ajoute quelques gouttes d'acide chlorhydrique immédiatement après la formation du précipité, celui-ci se dissout et la coloration bleue réapparaît; malheureusement, elle est de faible durée et le liquide passe peu à peu au gris ardoisé.

J'avais pensé trouver là un procédé d'extraction de la caryocyanine : précipitation par l'ammoniaque, filtration en quelques minutes sur disque de verre poreux, dissolution du précipité dans de l'eau additionnée d'acide chlorhydrique. La quantité de substance colorante qui passe en solution dans ces conditions d'expérience est très faible, elle teinte à peine le solvant en bleu ciel. De plus, la coloration obtenue n'est pas stable.

ACTION DES OXYDANTS ET DES REDUCTEURS

Un grand nombre de pigments bactériens sont sensibles aux agents oxydants ou aux agents réducteurs. C'est ainsi que, par réduction, la pyocyanine donne un leucodérivé, et il suffit d'oxygéner le milieu pour voir réapparaître la coloration bleue caractéristique.

WREDE (1930) a montré que la molécule de pyocyanine est capable de fixer quatre atomes d'hydrogène. Par sa facilité de réduction et de réoxydation, la pyocyanine peut se comporter comme un accepteur d'hydrogène.

On sait que la chlororaphine dérive, par réduction, d'une substance jaune peu colorée: la xanthroraphine. Les pigments bleus secrétés par *B. cyanogenus*, *B. cyaneo-fluorescens*, *B. cyaneo-fuscus*, *B. coeruleus* sont très sensibles à l'oxygène de l'air et se transforment peu à peu en des corps colorés bruns ou noirs qui représentent le terme ultime de l'oxydation.

Cette particularité qu'offrent certains pigments de s'oxyder et de se réduire facilement vient d'être étudiée d'une façon très approfondie par ELEMA (1931). ELEMA et SANDERS (1931).

Ce sont ces raisons qui m'ont conduite à essayer l'action de quelques oxydants (1) et de quelques réducteurs sur la caryocyanine.

PERHYDROL — EAU OXYGÉNÉE. — L'addition de perhydrol ou d'eau oxygénée à 20 volumes à la culture de *B. caryocyaneus* (séparée des corps microbiens) provoque une atténuation profonde de la coloration.

ACIDE PERCHLORIQUE. — L'acide perchlorique a été employé par WREDE pour la purification de la pyocyanine. Ajouté dans les cultures de *B. caryocyaneus*, cet acide n'a déterminé aucune modification de coloration du milieu ni aucune formation de précipité.

POUDRE DE ZINC. — Le zinc en poudre décolore partiellement le liquide bleu provenant de la filtration d'une culture de *B. caryocyaneus*.

POUDRE DE ZINC + ACIDE CHLORHYDRIQUE. — Sous l'influence d'une réduction énergique, telle que celle réalisée par le zinc et l'acide chlorhydrique, on note la disparition graduelle de la coloration bleue, une oxydation ménagée ultérieure détermine l'apparition d'une légère coloration violet-brun.

Nous avons déjà vu (1932) que le pigment bleu-violet secrété par *B. caryocyaneus* en milieu synthétique L_2 offrait une teinte très voisine de celui fabriqué par *B. cyaneo-fluorescens* dans les mêmes conditions de culture. Je résume dans le tableau suivant l'action de quelques agents chimiques sur la caryocyanine et le corps coloré produit par *B. cyaneo-fluorescens*.

(1) Et cela d'autant plus que les cultures de *B. caryocyaneus* passent du bleu au noir avec l'âge.

TABLEAU XX

RÉACTIFS CHIMIQUES UTILISÉS	LIQUIDE BLEU OBTENU par filtration ou par centrifugation des cultures de <i>B. caryocyanus</i>	LIQUIDE BLEU OBTENU par filtration ou par centrifugation des cultures de <i>B. cyaneo-fluorescens</i>
Potasse.....	Précipité vert soluble dans un excès de potasse avec formation d'une coloration brun rouge ou rouge brun.	Précipité vert soluble dans un excès de potasse avec production d'une coloration brun-rouge ou rouge-brun.
	Précipité vert soluble dans l'acide acétique avec production d'une teinte bleue.	Précipité vert soluble dans l'acide acétique avec formation d'une coloration bleue.
Ammoniaque.....	Précipité vert + acide acétique = coloration bleue.	Précipité vert + acide acétique = coloration bleue.
Acide chlorhydrique...	Coloration bleue + potasse = color. bleue.	Coloration bleue + potasse = color. bleue.
Acide perchlorique....	Pas de changement de colorat.; ni précipité.	Légère coloration violette; précipité.
Acide acétique.....	Pas de changement de coloration.	Pas de changement de coloration.
Tanin.....	Coloration verte et très léger précipité.	Coloration verte et très léger précipité.
Perhydrol-eau oxygénée	Décoloration partielle.	Décoloration partielle.
Acide chlorhydrique + zinc.....	Disparition de la coloration; oxydation ultérieure = faible coloration violet-brun.	
Poudre de zinc.....	Décoloration partielle.	

Il résulte de l'examen de ce tableau que la caryocyanine se rapproche beaucoup du corps coloré secrété par *B. cyaneo-fluorescens*. En présence de ces faits, j'ai essayé de caractériser la caryocyanine par son spectre d'absorption.

SPECTRE D'ABSORPTION

Etant donnée l'impossibilité dans laquelle je me suis trouvée d'isoler la caryocyanine, il ne pouvait être question du spectre d'absorption dans

l'ultra-violet. Seule, la partie visible du spectre pouvait être explorée sans présenter de trop grandes causes d'erreur. Aussi ai-je effectué les mesures à l'aide d'un spectroscope gradué en longueur d'onde qui dédouble très facilement la raie D du sodium en ses deux raies ($D_1 = 589,5$ et $D_2 = 588,9$).

L'examen a porté soit sur des cultures filtrées sur bougie L_3 , soit sur des cultures longuement centrifugées à 10.000 tours et de ce fait rigoureusement limpides.

LASSEUR (1926) a utilisé deux procédés dans l'étude des pigments microbiens : la méthode de HARTLEY et celle de FORMANEK-GRANDMOUGIN.

J'ai suivi la même technique que mon Maître; mais je me suis surtout efforcée de déterminer le maximum d'absorption de FORMANEK, ainsi que je l'indiquerai tout à l'heure. J'ai cependant relaté l'aspect du spectre visible pour des épaisseurs différentes de liquide coloré (méthode de HARTLEY).

La mesure du maximum d'absorption de FORMANEK gagnerait beaucoup en précision si elle était effectuée avec un spectrophotomètre; mais je ne disposais pas de pigment pur, par conséquent j'ai pensé qu'il suffisait de déterminer le maximum d'absorption sous des épaisseurs de liquide de plus en plus grandes, ainsi que le firent FORMANEK et GRANDMOUGIN.

L'emploi de verres fumés de A. KRUSS, recommandés par FORMANEK, permet d'obtenir assez facilement le maximum d'absorption.

Les résultats obtenus sont schématisés dans le tableau ci-dessous :

TABLEAU XXI

DÉSIGNA- TION des cultures	ÉPAISSEUR de la couche colorée en m/m	ABSORPTION de l'extrémité du spectre. Début du spectre lumineux	ABSORPTION SÉLECTIVE	ABSORPTION de l'extrémité du spectre Fin du spectre lumineux
—	—	—	—	—
A	5	$\lambda = 676$	$\lambda = 602$ à $\lambda = 581$	$\lambda = 432$
B	5		$\lambda = 602$ à $\lambda = 581$	
	10	$\lambda = 749$	$\lambda = 612,5$ à $\lambda = 578,5$	
	13	$\lambda = 716$	$\lambda = 615$ à $\lambda = 577$	$\lambda = 447$
	20	$\lambda = 710$	$\lambda = 627,5$ à $\lambda = 574$	$\lambda = 452$

Maximum de FORMANEK-GRANDMOUGIN : $\lambda = 588,5$

L'examen de ce tableau montre que la caryocyanine offre une absorption sélective, c'est-à-dire une bande d'absorption dont le maximum est à $\lambda = 588,5$ (1). Cette bande très forte, asymétrique, n'est pas sensiblement déplacée par addition d'acide.

L'addition de base détermine une précipitation et une diminution corrélatrice de l'intensité de l'absorption, mais sans déplacement appréciable de la bande. Lorsque la concentration en ions OH^- est suffisante pour précipiter la caryocyanine, la solution verte fluorescente obtenue ne présente plus d'absorption sélective. Elle n'offre plus qu'une « *endabsorption* », absorption continue à partir de $\lambda = 432$.

Différenciation de la caryocyanine et de quelques pigments bactériens à l'aide du spectre d'absorption

PYOCYANINE

D'après LASSEUR et GIRARDET (1926), le pigment bleu sécrété par *B. pyocyaneus* donne: 1) une absorption continue du spectre de $\lambda = 730$ à $\lambda = 709$ ou 532 , suivant l'épaisseur de la couche liquide examinée; 2) une absorption continue de l'extrémité du spectre visible, la fin du spectre lumineux variant de $\lambda = 417$ à $\lambda = 430$, suivant l'épaisseur de liquide considérée.

Avec le chlorhydrate de pyocyanine, on a bien une absorption sélective sous forme d'une large bande asymétrique; mais le maximum d'absorption de FORMANEK-GRANDMOUGIN est assez difficile à préciser. La bande s'étend néanmoins de $\lambda = 546$ à $\lambda = 530$ (pour une épaisseur de liquide de 5 mm.).

PIGMENT FABRIQUÉ PAR *B. CYANOGENUS*

Le pigment produit par *B. cyanogenus* offrirait une large bande s'étendant de $\lambda = 605$ à $\lambda = 550$. Il y a lieu de faire des réserves sur ces valeurs, car elles ont été calculées par HENOCQUE, d'après les figures de NEELSEN (1880).

Sous l'action de la potasse, la culture de *B. cyanogenus* passe au rouge

(1) Sans vouloir en aucune façon préjuger de la composition de la caryocyanine, je rappellerai que FORMANEK et GRANDMOUGIN ont trouvé comme maximum d'absorption $\lambda = 588,5$ pour la substance colorante « *Echtblau R.* ».

ou au rouge brique et la bande commence vers $\lambda = 580$ et s'étend jusqu'à $\lambda = 470$.

PIGMENT SECRÉTÉ PAR *B. POLYCHROMOGENES*

THIRY (1900) a montré que les solutions aqueuses bleu-clair de ce pigment donnent au spectroscope une bande d'absorption dans le voisinage de la raie D du sodium. Le maximum d'absorption est à $\lambda = 594$. Outre cette bande, on note « *dans le rouge, un assombrissement léger du spectre, et dans le bleu, s'étendant jusque dans l'extrême violet, une semblable absorption* ».

L'addition d'acide déplace la bande principale et le maximum d'absorption est à $\lambda = 570$.

En résumé, la caryocyanine se différencie bien des pigments produits par *B. pyocyaneus*, *B. cyanogenus* et *B. polychromogenes*. Je pensais trouver dans le spectre d'absorption un élément de différenciation des matières colorantes fabriquées par *B. caryocyaneus* et par *B. cyaneo-fluorescens*. L'examen spectroscopique d'une culture (1) de *B. cyaneo-fluorescens* déceut (pour une épaisseur de 10 mm.), l'existence d'une absorption sélective s'étendant de $\lambda = 608$ à $\lambda = 570$, et dont le maximum d'absorption de FORMANEK est aux environs de $\lambda = 588,5$.

Il résulte de cette observation que les deux pigments ci-dessus paraissent offrir le même maximum d'absorption de FORMANEK. Mais il ne faut pas oublier que je n'ai envisagé que la partie visible du spectre, et que les deux pigments peuvent posséder des bandes d'absorption différentes dans l'ultraviolet. C'est ainsi que LASSEUR a montré (1926) que l'oxychlororaphine réduite et la prodigiosine en solution alcoolique possèdent une bande commune à $\lambda = 537,4$. Or, grâce aux belles recherches de KÖGL et POSTOWSKY (1930) d'une part, de WREDE et HETTICHE (1929) d'autre part, on sait que l'oxychlororaphine et la prodigiosine ont une composition chimique différente.

Les jeunes cultures de *B. caryocyaneus* et de *B. cyaneo-fluorescens* sont, il est vrai, colorées en bleu, mais la nuance est différente dans les deux cas. A l'aide du photocolorimètre de TOUSSAINT (cellule photoélectrique), j'ai déterminé les « courbes de couleur » des corps colorés fa-

(1) Séparée des corps microbiens par filtration ou par centrifugation.

briqués par *B. caryocyaneus* et *B. cyaneo-fluorescens*, que je reproduis ci-dessous :

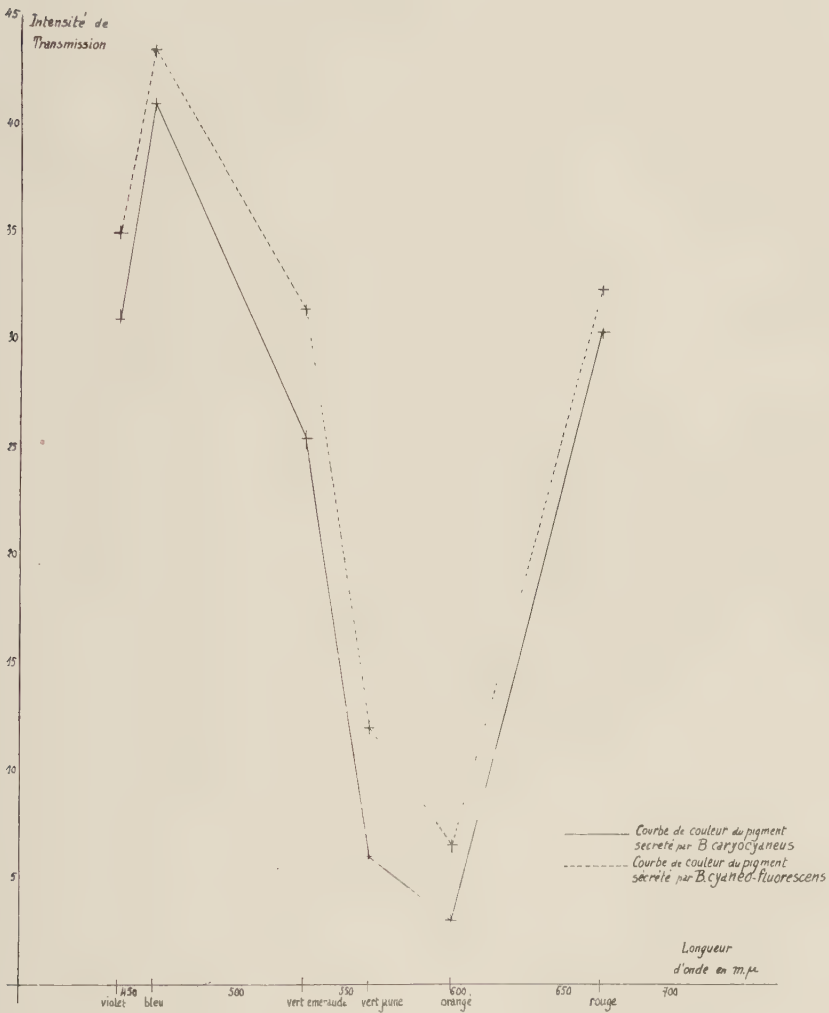


Fig. 8

Courbes de couleur
des pigments secrétés par *B. caryocyaneus* et par *B. cyaneo-fluorescens*.

Les expériences ont montré que l'intensité de transmission est surtout différente pour les radiations $\lambda = 560$ et $\lambda = 598$.

Rôle des pigments bactériens

On a beaucoup discuté sur le rôle des pigments bactériens, et la question n'est pas près d'être résolue, même dans le cas le plus favorable à l'étude de ce problème, je veux parler de celui des Bactéries pourpres.

Tout le monde connaît le travail classique d'ENGELMANN (1883-1888) sur les Bactéries pourpres. Ce savant pensait que ces microorganismes étaient capables de décomposer CO_2 en présence de radiations lumineuses avec rejet d'oxygène.

Les expériences d'ENGELMANN attribuaient donc une photosynthèse particulière à la bactériopurpurine.

Les faits observés par ENGELMANN ont été contestés par MOLISCH et WINOGRADSKY; mais ils furent confirmés par DANGEARD. D'ailleurs, MOLISCH, avec la prudence du savant, laisse croire à la possibilité d'un rôle biologique de la bactériopurpurine en invoquant l'hypothèse d'une photosynthèse spéciale.

Cette question fut reprise par EWART (1897) et SKENE (1914); elle se trouve synthétisée dans les recherches de BUDER (1919). Lorsqu'on veut tenir compte des faits observés par ENGELMANN et par WINOGRADSKY, on éprouve une assez grande difficulté à expliquer le métabolisme des *Thiorhodaceæ*. Ainsi que le fait remarquer BUDER, on est conduit à admettre l'existence d'une photosynthèse (ENGELMANN) et d'une chimiosynthèse (WINOGRADSKY). Il n'y a pas d'objection grave à cette conception des faits, puisque nous retrouvons une théorie analogue dans l'assimilation chlorophyllienne.

BUDER pense que l'hypothèse d'une photosynthèse s'impose presque pour les Bactéries pourpres, à la condition que ces Bactéries utilisent l'oxygène libéré pour oxyder H_2S .

BAVENDAMM (1924) reprend l'hypothèse d'une photosynthèse et d'une chimiosynthèse, ce que nous exprimerons en disant : les Bactéries pourpres peuvent réduire CO_2 (photosynthèse) avec mise en liberté d'oxygène qui leur permet d'oxyder H_2S (chimiosynthèse). Selon BAVENDAMM, lorsque H_2S fait défaut, les Bactéries pourpres pourraient encore se développer, tandis que les formes incolores devraient mourir (1). Malheureusement, ce savant émet une conclusion contradictoire à la page suivante.

(1) Les Bactéries pourpres auraient donc sur les Sulfuraires incolores la supériorité suivante : dans des conditions anaérobies, elles pourraient pourvoir elles-mêmes à leur besoin en oxygène par décomposition photosynthétique de CO_2 .

« Chaque organisme spécial peut accomplir une activation spécifique de certains atomes d'hydrogène dans le substratum. Quand l'activation a atteint un certain degré, cet hydrogène, activé peut être transporté à un accepteur qui, à son tour, est aussi activé. »

Cette hypothèse de travail a permis de se rendre compte du métabolisme microbien dans de nombreuses recherches importantes que nous devons à l'Ecole de DELFT. NIEL estime que cette théorie peut donner une explication partielle du métabolisme des Bactéries pourpres. Dans l'hypothèse d'une photosynthèse et d'une chimiosynthèse séparées, il n'y aurait pas de relation quantitative entre H_2SO_4 , O_2 et « CO_2 réduit » ; mais si H_2S est considéré comme donneur d'hydrogène, on observe une relation définie entre les produits de réaction : CO_2 réduit, S et H_2SO_4 , et ainsi se trouve expliqué le fait que les Bactéries pourpres ne peuvent pas vivre en l'absence d' H_2S (1).

NIEL, à qui nous devons une série de travaux remarquables de Microbiologie générale, pense que toute tentative d'explication du métabolisme des Bactéries pourpres doit tenir compte des faits suivants : l'hydrogène sulfuré et la lumière sont indispensables à la vie de ces microorganismes. Le savant hollandais, tout en reconnaissant qu'il n'y a pas d'objection fondamentale à l'existence d'une photosynthèse et d'une chimiosynthèse indépendantes, calcule sur les données de WINOGRADSKY « la quantité de CO_2 qui peut être réduite chimiosynthétiquement à l'aide de l'O libéré photosynthétiquement ». NIEL trouve que « 80 molécules de CO_2 doivent être réduites photosynthétiquement afin de fournir l'O nécessaire pour la réduction chimiosynthétique d'une seule molécule de CO_2 . Quantitativement, la chimiosynthèse n'apparaît pas nécessaire ». Après avoir rappelé les théories de WIELAND (1912-1922), de THUNBERG (1923), NIEL développe la théorie de « unity in biochemistry », de KLUYVER et DONKER (1926).

Puis VAN NIEL reprend, sur des bases nouvelles, l'étude expérimentale du métabolisme des Bactéries sulfuraires. Le savant hollandais admet l'existence de deux photosynthèses, l'une normale, propre aux Bactéries pourpres, l'autre anormale où H_2O est remplacé par un autre donneur d'hydrogène, ces processus de photosynthèse offrent, avec la photosynthèse des plantes vertes, des différences profondes.

Telle est, brièvement résumée, l'histoire du rôle biologique de la bac-

(1) Remarquons en passant que la photosynthèse et la chimiosynthèse pourraient se concevoir comme dépendantes et non comme nettement séparées.

tériopurpurine. Si ces données ne sont pas précises, nos connaissances sur le rôle biologique des autres pigments sont encore bien plus rudimentaires.

Remarquons tout d'abord que la vie des Bactéries n'est pas obligatoirement liée à la production de corps colorés. « *La fonction chromogène chez les Bactéries n'est pas une fonction nécessaire* » (G. BOHN, 1901); en effet, de nombreuses Bactéries chromogènes donnent plus facilement des cultures peu colorées que des cultures très colorées.

Il faut cependant noter que l'on éprouve de grosses difficultés à maintenir des races rigoureusement achromogènes. Le plus souvent des cultures, dites incolores, renferment encore une très faible quantité de corps coloré et la suppression de toute trace de pigment est extrêmement difficile (1). Néanmoins, la diminution considérable de la quantité de substance colorée produite semble montrer que si cette dernière joue un rôle, ce rôle est assez limité, à moins que le pigment ne représente le terme final d'une série de réactions chimiques. Le plus souvent, le pigment, relativement stable, semble dériver d'une substance incolore qui, elle, est essentiellement instable, exemples de la xanthoraphine, de la substance-mère de la caryocyanine ou de la prodigiosine, etc... Par leur instabilité, ces substances se prêtent à des phénomènes d'oxydation et de réduction et par suite peuvent jouer un rôle dans le métabolisme bactérien.

Parfois, le corps coloré est assez instable, tel est l'exemple de la pyocyanine. Des observations anciennes ont montré que des cultures de *Bacille pyocyanique* d'âge convenable (en solution peptonée) sont incolores ou présentent tout au plus un fin liseré bleu ou verdâtre. Or, il suffit d'agiter violemment la culture pour que toute la masse liquide se colore en bleu ou en vert plus ou moins foncé. Ce phénomène s'explique très facilement depuis que WREDE (1930) a montré que la molécule de pyocyanine peut fixer quatre atomes d'hydrogène. Par sa facilité de réduction et de réoxydation, la pyocyanine peut donc se comporter comme un accepteur d'hydrogène.

FRIEDHEM (1932) attribue un rôle respiratoire au pigment fabriqué par *B. violaceus*. Une solution de ce pigment dans la glycérine ajoutée à une suspension de « *Bacille violet non pigmenté* » augmenterait « *la respiration jusqu'à 234 p. 100* » (2). L'auteur a montré que le pigment de

(1) Tels sont du moins les faits que nous avons observés avec un grand nombre de germes de la collection du Laboratoire de Microbiologie.

(2) Et KEILIN (1925) admet l'existence d'un cytochrome, pigment respiratoire intracellulaire commun aux Bactéries, aux Levures, aux plantes supérieures et aux animaux.

B. violaceus est très facilement réduit en leuco-dérivé, mais que sa réduction à l'air « ne s'observe guère, même en faisant agir les oxydants tels que le ferricyanure et le persulfate de potasse et l'eau oxygénée ». FRIEDHEM conclut que le pigment « accélère la respiration en sa qualité d'accepteur d'hydrogène, mais on ne peut pas dire qu'il soit un catalyseur parfait régénéré au cours d'un cycle ».

Le pigment sécrété par *B. violaceus* se comporterait donc « quant à ses fonctions physiologiques, comme la pyocyanine ».

LASSEUR (1911) a établi que la chlororaphine dérive par réduction d'une substance jaune, xanthoraphine. Se souvenant que la réduction de CO₂ par oxydation d'NH₃ s'explique (LOEW, 1891) par un couplage entre deux réactions, LASSEUR a recherché s'il n'était pas possible de déceler la présence simultanée ou successive d'oxydation et de réduction dans la production de la chlororaphine.

Ainsi se trouve esquissé le rôle des oxydo-réductions dans la production des pigments bactériens.

BIBLIOGRAPHIE

- BERTRAND (G.). — *Bull. Soc. Chim.*, T. 21, 3^e série, p. 434-439, 1899.
BOHN (G.). — L'évolution du pigment; *Scientia, Biologie*, n° 11, 96 pages, 1901.
CASTELLI TOMMASO. — *Giornale di Biologia applicata alla Industria chimica*, T. II, n° 4, 1932.
DANGEARD (P.-A.). — *C. R. Acad. Sc.*, T. 153, p. 963, 1911.
DIDIER SIMON (M.-J.). — *Thèse Sciences*, Nancy, 1908.
DUCLAUX (E.). — *Traité de Microbiologie générale*, T. 1, p. 322-328, Paris, Masson, 1898.
DUPAIX (A.). — *Trav. Laborat. Microbiol. Faculté Pharmacie*, Nancy, fasc. IV, p. 31-43, 1931.
ELEMA (B.) et SANDERS (A.-C.). — *Recueil des Trav. chimiques des Pays-Bas*, T. 50, n° 7-8, p. 796-806, 1931.
ELEMA (B.). — *Recueil des Trav. chimiques des Pays-Bas*, T. 50, n° 7-8, p. 806-826, 1931.
ENGELMANN (Th.-W.). — *Pflüger's Arch. f. d. ges. Physiol.*, Bd 30, p. 95-124, 1883; *Bot. Zeitg.*, Bd. 46, p. 661, 1888.
FRIEDHEM (E.-A.-H.). — *C. R. Soc. biol.*, T. CX, p. 353-356, 1932; T. CXI, p. 505-507, 1932.
FORMANEK (J.) et GRANDMOUGIN (E.). — *Untersuchung und Nachweis organischer Farbstoffe auf spektroskopischem Wege. Erster Teil*; Julius SPRINGER, Berlin, 1908.
KEILIN (D.). — *Proceed. of the Roy. Soc.*, B, vol. 98, p. 312-339, 1925; vol. 100, p. 129-151, 1926.

- KÖGL (F.) et POSTOWSKY (J.-J.). — *Liebigs Ann. d. Chemie*, Bd. 444, p. 1-7, 1925.
- KÖGL (F.) et von TAEUFFENBACH (G.). — *Liebigs Ann. d. Chemie*, Bd. 445, p. 170-180, 1925.
- KÖGL (F.). — *Liebigs. Ann. d. Chemie*, Bd. 447, p. 78-85, 1926.
- KÖGL (F.) et BECKER (H.). — *Liebigs Ann. d. Chemie*, Bd. 465, Heft. 3, p. 211-242, 1928.
- KÖGL (F.). — *Liebigs Ann. d. Chemie*, Bd. 465, Heft 3, p. 243-256, 1928.
- KÖGL (F.) et ERXLEBEN (H.). — *Liebigs Ann. d. Chemie*, Bd. 479, Heft 1 et 2, p. 11-26, 1930.
- KÖGL (F.) et POSTOWSKY (J.-J.). — *Liebigs Ann. d. Chemie*, Bd. 480, Heft 2 et 3, p. 280-297, 1930.
- KÖGL (F.), ERXLEBEN (H.) et JANECKE (L.). — *Liebigs Ann. d. Chemie*, Bd. 482, Heft 2 et 3, p. 105-119, 1930.
- KÖGL (F.) et ERXLEBEN (H.). — *Liebigs Ann. d. Chemie*, Bd. 484, Heft 1, p. 65-84, 1930.
- KÖGL (F.) et TÖNNIS (B.). — *Liebigs Ann. d. Chemie*, Bd. 497, Heft 3, p. 265-289, 1932.
- LASSEUR (Ph.). — *C. R. Soc. biol.*, T. LXXIII, p. 47, 1912; *C. R. Soc. biol.*, T. LXXIV, p. 163, 1913; *C. R. Soc. biol.*, T. LXXIV, p. 496, 1913; *C. R. Soc. biol.*, T. LXXVI, p. 900, 1914.
- LASSEUR (Ph.) et GIRARDET (F.). — *Bull. Soc. Sc. Nancy*, Série IV, T. III, fasc. I, p. 1-77, 1926.
- MATRUCHOT (L.). — *Miscellanées biologiques*, dédiées au Prof. Giard, p. 452-477, 1899 (tirage à part).
- MULLER (F.-M.). — *On the metabolism of the purple sulphur Bacteria in organic media*, p. 131-166, Julius Springer, Berlin, 1933.
- VAN NIEL (C.-B.). — *Contributions to Marine Biology*, Stanford Univ. Press., p. 161-169, 1930; *Archiv f. Mikrobiol.*, Bd. 3, Heft I, p. 1-112, 1931.
- VAN NIEL (C.-B.) et MULLER (F.-M.). — *Recueil des Trav. Bot. neerl.*, vol. XXVIII, p. 245-274, 1931.
- SEPPILI (A.). — *Boll. del. Scz. ital., Soc. intern. d. microbiol.*, vol. III, fasc. V, A. IX, p. 178-181, 1931; *Boll. dell' Istituto Sierot. Milanese*, fasc. VII, 1931 (tirages à part).
- SEPPILI (A.) et DENES (R.). — *Diagnostica e tecnica di Laboratorio*, vol. II, IX, n° 7, p. 1-6, 1931.
- VELLINGER (E.). — *C. R. Soc. biol.*, T. CXII, p. 303-305, 306-308, 1932.
- WINOGRADSKY (S.). — *Bot. Zeitg*, Bd 45, p. 493, 1887; *Beitrag zur Morphologie und Biologie der Bakterien*, Heft 1, Schwefelbakterien, Leipzig, 1888.
- WREDE (F.) et STRACK (E.). — *Berichte d. Deuts. Chem. Gesell.*, Jahrg. 62, Heft 8, p. 2051-2057, 1929.
- WREDE (F.) et HETTICHE (O.). — *Berichte d. Deuts. Chem. Gesell.*, Jahr. 62, Heft 9, p. 2678-2685, 1929.
- WREDE (F.). — *Zeitschr. f. Hyg. u. Infekt.*, Bd. 111, Heft 1, p. 90-96, 1930.

CHAPITRE IV

ACTION DE DIFFÉRENTES SUBSTANCES CHIMIQUES SUR LA VIE DE *B. CARYOCYANEUS*

Généralités.

E. DUCLAUX (1898) a longuement insisté sur la difficulté que l'on éprouve à établir une démarcation nette entre l'aliment et l'antiseptique.

Aux faibles concentrations, le sucre est un aliment pour les Levures, mais aux fortes concentrations, il s'oppose au développement des Champignons et des Bactéries. La valeur de cette concentration critique varie avec l'espèce microbienne considérée. De même, les produits de la vie microbienne (alcool, acide lactique...) arrêtent tout développement bactérien lorsqu'ils atteignent une concentration déterminée dans le milieu de culture, bien que, pour des concentrations plus faibles, ces mêmes substances puissent jouer le rôle d'aliment vis-à-vis de certains microorganismes. L'aldéhyde formique, antiseptique puissant à une certaine concentration, peut même être utilisé par *Tyrothrix tenuis* lorsqu'il est fourni à ce microorganisme à une concentration appropriée (E. DUCLAUX).

Il résulte des travaux de G. THIRY (1913) sur *B. pyocyaneus*, que la lactophénine à l'état de traces très faibles, favorise la production de la pyocyanine. Et E. DUCLAUX (1898) a montré que l'addition de doses croissantes d'antiseptique à une fermentation alcoolique se traduit tout d'abord par une augmentation du dégagement de CO_2 qui diminue rapidement à mesure que croît la concentration de l'antiseptique.

Etant donné le rôle considérable de la concentration, il est bien difficile d'établir une distinction entre l'antiseptique et l'aliment.

Si, au lieu d'envisager le pouvoir ferment ou le pouvoir chromogène, on fait porter l'examen sur la forme ou la multiplication cellulaire, on constate que les antiseptiques se comportent de façons différentes. Les uns coagulent, précipitent les systèmes colloïdaux constitutifs de la cellule, les autres déterminent l'hydratation ou la peptisation de l'élément bactérien.

Pour des raisons didactiques, j'ai, dans les chapitres précédents, étu-

dié séparément la morphologie et la physiologie de *B. caryocyaneus*, mais on sait qu'il est difficile de séparer l'évolution morphologique du fonctionnement physiologique, il y a une histoire unique de l'individu qui comprend à la fois sa morphologie et sa physiologie. C'est le motif pour lequel, dans les essais relatifs aux antiseptiques, j'exposerai simultanément les modifications de forme et de fonctions de *B. caryocyaneus*.

Lorsqu'on étudie l'action d'un agent chimique toxique sur une plasmide bactérienne, on peut avoir en vue la destruction du microbe ou tout simplement la façon dont réagit l'espèce microbienne à l'élément chimique considéré. Dans mes recherches, je me suis placée au second point de vue, en partant du principe que le tableau de la vie d'une espèce n'est valable que pour des conditions déterminées. Ce tableau change si on fait varier les conditions de vie. A des facteurs nouveaux, la Bactérie répond par des réactions morphologiques ou physiologiques qui cessent généralement dès que disparaissent les causes qui les ont déterminées.

L'action des agents chimiques sur les Bactéries a suscité un nombre considérable de recherches; il n'entre pas dans le cadre de ce travail d'en faire une bibliographie, même restreinte; je citerai seulement en passant les travaux de KOCH (1881), STERNBERG (1883), MIQUEL (1884), STILLING (1890), KRÖNIG et PAUL (1897), E. DUCLAUX (1898-1900), MIQUEL et CAMBIER (1902), VINCENT (1907-1908, 1931-1932), MADSEN et NYMAN (1907), BIDZINSKY (1926), VELLUZ (1931), RIDEAL et WALKER (1921), MULLER et J. LOMMEL (1926), J. LOMMEL (1926), BOAS (1927), HOLLANDE et G. CRÉMIEUX (1928), KENIG (1929), G. CRÉMIEUX (1930), J. RÉGNIER et S. LAMBIN (1931), BECHHOLD (1919-1923-1924-1926-1927-1931), etc...

L'étude de l'action microbicide d'une substance peut être considérée au point de vue théorique et au point de vue pratique. C'est en s'inspirant de la première conception que MADSEN et NYMAN (1907) ont étudié la destruction de *B. anthracis* par le sublimé à des températures variables. Il ressort des expériences de l'Ecole de COPENHAGUE que cette destruction peut être représentée par la formule des réactions monomoléculaires.

« Miss CHICK, reprenant les valeurs des expériences de PAUL et KRÖNIG sur l'action antiseptique des sels de mercure (cf. p. 167), puis exécutant des expériences sur l'action du phénol vis-à-vis de diverses bactéries » (VLÈS, p. 347) arrive à des conclusions analogues à celles de MADSEN et NYMAN. Et VLÈS admet que, d'une façon générale, le « problème montre cinq variables » (p. 347). En réalité, le nombre des variables est bien supérieur à cinq et la concordance entre les nombres

calculés et les nombres trouvés est d'autant plus grande que l'on fait intervenir plus de variables. Les uns dépendent du germe, de l'antiséptique et du milieu de dispersion, les autres sont liées au temps de contact, à la température, à la nature des différentes radiations, à l'action de diverses substances sur la perméabilité de la membrane, etc...

Parmi les facteurs d'action qui relèvent du germe, il faut considérer l'influence de l'espèce, de la race, de la souche, l'âge des cultures (stade d'évolution), l'origine (accoutumance), les variations individuelles. Pour une culture d'âge déterminé, on doit tenir compte de la concentration de la suspension en germes (1), du temps depuis lequel les plastides sont en suspension, etc.

L'agent chimique doit être envisagé au point de vue de sa nature (constitution chimique), de son volume moléculaire, du rapport S/V, de son degré de dispersion (ionisation), de sa concentration, de la charge électrique de l'ion toxique, de sa répartition par diffusion ou brassage, etc...

Le milieu dispersif intervient par sa nature chimique, sa réaction (concentration en ions H+) son pouvoir ionisant, sa tension superficielle, son action sur la perméabilité de la membrane. Il ne faut pas oublier que certains corps peuvent déterminer un équilibre de DONNAN, et par conséquent faire varier la pression osmotique du système. De même, on ne saurait perdre de vue le phénomène de neutralisation des ions au sens de LOEB.

G. BOHN et A. DRZEWINA ont attiré l'attention sur un fait extrêmement curieux, l'importance du « facteur de masse », c'est ce qui ressort bien de l'expérience ci-dessous : « On a deux tubes dont l'un a contient 6,2 cc. de sperme dilué au 100° et l'autre, b, 6,2 cc. de sperme au 1000°, on ajoute X (dix) gouttes de rouge neutre au 20.000° au premier de ces tubes, et on ajoute I (une) goutte seulement au dernier. De la sorte, la masse de la matière colorante se trouve être répartie proportionnellement à la masse du sperme, mais le taux en est 10 fois plus fort dans a que dans b. C'est cependant dans a que le sperme reste plus actif, puisqu'au bout de 20 minutes il féconde encore 50 p. 100 des œufs, alors que celui du tube b n'en féconde plus que 2 p. 100. »

Les faits observés par G. BOHN et A. DRZEWINA pourraient peut-être

¹ (1) Dans certaines expériences, les germes à étudier sont supportés par des substrats divers (papier, fibres, lames, etc.) qui peuvent par adsorption être une cause d'erreur très importante. C'est ce qui découle notamment des travaux de Bechhold (1923-1924).

s'expliquer en faisant intervenir la notion d'adsorption. Pour les faibles concentrations en colorant (systèmes peu riches en éléments cellulaires), l'adsorption peut être totale ou atteindre une valeur très grande, 90, 95, 98 %, tandis que pour les fortes concentrations (systèmes 10 fois plus riches en éléments cellulaires) l'adsorption est beaucoup moins intense. Elle peut n'atteindre par exemple que 40-50 % du colorant mis en œuvre. Et on conçoit alors que les spermatozoïdes puissent fixer dans les deux cas des quantités de colorant très différentes. Telle est du moins l'hypothèse émise par Ph. LASSEUR et A. DUPAIX pour expliquer le phénomène de « masse » décrit par BOHN et DRZEWINA.

Le rôle de l'adsorption dans la désinfection a été particulièrement bien mis en évidence par BECHHOLD (1914-1923-1924-1925-1927).

L'action des agents chimiques sur les Bactéries ne peut guère être ramenée à un schéma simple. Cependant, en première approximation, on peut être tenté de chercher une relation entre la concentration de l'antiseptique et le temps d'action du désinfectant. C'est ce qui a été réalisé par WATSON lorsqu'il écrit :

$$C^mt = \text{constante}$$

ou C = concentration de l'antiseptique,
m = constante variable avec chaque antiseptique,
t = temps.

PHELPS fait intervenir en outre le nombre de germes et propose la formule :

$$\log \frac{n_0}{n} = KC^m (t - t_0)$$

n_0 et n = nombre de Bactéries existant aux temps t_0 et t .

Pour KISS, le pouvoir bactéricide serait fonction du rapport

$$\frac{\text{Poids atomique}}{\text{Poids spécifique du métal à l'état solide}}$$

tandis que BLAKE ferait jouer un rôle au poids atomique.

Ces généralités étant établies, j'envisagerai maintenant le pouvoir antiseptique de différentes substances, et tout d'abord de l'acide phénique.

Action bactéricide de l'acide phénique

Les auteurs anglais RIDEAL et WALKER (1921) en particulier expriment le pouvoir antiseptique d'une substance en fonction du pouvoir antiseptique du phénol. Pour cela, ils déterminent les dilutions D_1 et D_2 d'un antiseptique x et de phénol qui déterminent la mort de l'unité de Bactéries dans l'unité de temps. Le coefficient de RIDEAL et WALKER est égal à $\frac{D_1}{D_2}$.

Les auteurs signalent l'importance considérable d'une cause d'erreur dans ces déterminations, c'est la présence de crésols dans le phénol du commerce. Les crésols possèdent, en effet, un pouvoir bactéricide approximativement trois fois plus élevé que celui du phénol.

Aussi, deux éminents bactériologistes, J. RÉGNIER et S. LAMBIN, essaient-ils de « résoudre le problème, non plus à la façon des auteurs anglo-saxons, qui se bornent à définir une valeur relative (méthode du coefficient phénol), mais à la façon des anciens bactériologistes, qui cherchaient à définir une valeur absolue ». J. RÉGNIER et S. LAMBIN cherchent, « en précisant de plus en plus les conditions expérimentales, à les appliquer non seulement à l'étude des valeurs antigénétiques, comme l'avaient fait la plupart de ces auteurs, mais encore à l'étude des valeurs antibiotiques ».

J'ai alors étudié l'influence de l'acide phénique sur les cultures de *B. caryocyaneus* et de quelques Bactéries fluorescentes (1).

TECHNIQUE

PROTOCOLE D'EXPERIENCE

L'expérience est conduite d'après le schéma suivant :

TABLEAU XXII

DÉSIGNA- TION des systèmes	EAU PEPTONÉE à 2 %	EAU PHYSIOLO- GIQUE	SOLUTION D'ACIDE PHÉNIQUE à 5 %	SUSPENSION MICRO- BIENNE	CONCEN- TRATION des systèmes en acide phénique exprimée en gr. 0/00
A	5 cm ³	3,95 cm ³	0,05 cm ³	1 cm ³	0,25
M	5	3	1	1	5
Témoin	5	4	0	1	0

(1) Ces essais ont été effectués en collaboration avec mon camarade J. RAUX à qui j'adresse ici tous mes remerciements.

Pour les systèmes B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, les concentrations respectives en acide phénique ont varié de 0 gr. 5 à 4 gr. 5 0/00.

Le détail de l'expérience peut être résumé de la façon suivante : dans une série de tubes A, B, C, D..., on distribue tout d'abord l'eau peptonée (de pH = 7), puis des doses décroissantes d'eau physiologique. On stérilise à 115° C pendant 30 minutes et, après refroidissement, on ajoute la solution d'acide phénique. Chaque tube est alors ensemencé avec un même volume (1 cm³) d'une suspension homogène de la Bactérie à étudier. La concentration de la suspension bactérienne est telle qu'elle ne doit déterminer aucun trouble dans le milieu auquel on l'ajoute. Cette concentration est de l'ordre de 200.000.000 de germes au centimètre cube. La concentration finale des systèmes est donc de 20.000.000 par centimètre cube. Les Bactéries proviennent de cultures âgées de 48 heures et effectuées sur gélose peptone de pH = 7.

SOLUTION D'ACIDE PHÉNIQUE

La solution d'acide phénique utilisée dans ces essais était une solution à 5 %. Cette solution a été titrée par la méthode au brome de KOPPECHAR.

Après des temps déterminés de 4, 6, 8 jours, on prélève dans chaque tube 0 cm³ 5 que l'on transporte en milieu synthétique L₁ qui, on le sait, est le milieu nutritif le plus propre à mettre en évidence les propriétés caractéristiques de *B. caryocaneus*.

Qu'il s'agisse de l'action de la température ou de l'action d'un agent chimique, sur les plastides bactériennes, le pourcentage apparent de germes tués varie avec le réactif (milieu de culture ou animal) utilisé pour déceler les plastides vivantes.

S'il faut tenir compte de la destruction cellulaire ou humorale des germes dans un organisme vivant, il ne faut pas oublier aussi que lorsqu'on transporte des Bactéries vivantes dans un milieu nutritif, un nombre plus ou moins considérable de plastides ne se multiplie pas (1).

C'est ainsi que des travaux anciens de BEHRING, GEPPERT, HAHN, LANGE s'efforcent d'établir une « dissociation » entre le pouvoir antiseptique et le pouvoir empêchant.

Dans son étude relative au pouvoir antiseptique du Cristal violet sur

(1) Tous ceux qui ont fait des isollements à partir d'une plastide unique connaissent bien cet écueil inévitable.

la Bactéridie charbonneuse, WIESNER (1926) constate le fait suivant : le pouvoir empêchant du Cristal violet atteint le 1/40.000 lorsqu'on réensemence sur bouillon Supfle, tandis que l'inoculation détermine toujours la mort de la Souris, même pour les mélanges dont la concentration en Cristal violet varie de 1/800 à 1/40.000.

Ces faits, s'ils sont exacts, peuvent s'interpréter de deux façons :

PREMIÈRE HYPOTHÈSE : L'organisme Souris constitue donc un milieu plus favorable au développement du Bacille du Charbon que le bouillon Supfle. Or, l'étude quantitative de la destruction des Bactéries montre que pour toute une série de concentrations, la destruction n'atteint pas 100 % des germes expérimentés. Certaines plastides résistent à l'action de l'antiseptique. On sait aussi qu'un très petit nombre de plastides suffit à déterminer le charbon expérimental. Les faits décrits par WIESNER (1926) pourraient s'interpréter par la survivance de quelques plastides pour toutes les zones de concentration en Cristal violet variant de 1/800 à 1/40.000.

DEUXIÈME HYPOTHÈSE : Nous verrons tout à l'heure que la fixation d'un colorant (Bleu de Nil, Erythrosine), même en quantité importante, n'entraîne pas obligatoirement la mort immédiate des plastides bactériennes. On conçoit alors que la réversibilité de l'adsorption puisse se produire lorsqu'on transporte les Bactéries du système bouillon + colorant dans l'organisme vivant ; d'où l'importance qui s'attache au choix du milieu destiné à déceler les plastides vivantes.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

B. caryocyanus sécrétant un pigment fluorescent, j'ai étudié l'action de l'acide phénique, non seulement sur le germe isolé par BEIJERINCK, mais encore sur des Bactéries offrant des affinités avec *B. caryocyanus*.

J'envisagerai successivement l'influence de l'acide phénique sur la végétation de *B. caryocyanus* et de différentes Bactéries fluorescentes, puis les modifications morphologiques déterminées par l'antiseptique.

ACTION DE L'ACIDE PHÉNIQUE SUR LA VÉGÉTATION

Les tableaux XXIII et XXIV résument les faits relatifs à l'arrêt de la végétation et à la mort des plastides de *B. caryocyanus* et de différentes Bactéries fluorescentes par l'acide phénique.

TABLEAU XXIII

Aspect des cultures de *B. caryocyanus* en eau peptonée
additionnée de doses croissantes d'acide phénique

AGE DES CULTURES	CONCENTRATIONS DES SYSTÈMES EN ACIDE PHÉNIQUEEXPRIMÉES EN GRAMMES POUR 1000					
	A	B	C	D	E	F G
4 jours	0,25 trouble	0,50 pas de vé- gétation apparente	0,75 pas de vé- gétation	1 pas de vé- gétation	1,25 pas de vé- gétation	1,5 pas de vé- gétation 2 pas de vé- gétation
7 jours	trouble sur 8-10 millimètres ; légère fluorescence verte	50 % des tubes ; léger trouble 50 % des tubes ; pas de vé- gétation	pas de vé- gétation	pas de vé- gétation	pas de vé- gétation	pas de vé- gétation
8 jours	trouble fluorescence	50 % : trouble 50 % : pas de vé- gétation	pas de vé- gétation	pas de vé- gétation	pas de vé- gétation	pas de vé- gétation

TABLEAU XXIV

Action de l'acide phénique
sur différentes Bactéries fluorescentes

DÉSIGNATION	ARRÊT DU DÉVELOPPEMENT (eau peptonée phéniquée)		ARRÊT DE LA VIE (milieu L ₁)
	concentration critique exprimée en gr. 0/00	concentration infertilisante exprimée en gr. 0/00	concentration mortelle exprimée en gr. 0/00
des			
espèces microbiennes			
—			
<i>B. caryocyaneus</i>	0,5	0,75	2
<i>B. chlororaphis</i>	0,5	0,75	2
<i>B. fluorescens albus</i>		1,25	2
Bacille fluorescent pathogène pour les plantes.....	0,75	1	1
Bacille fluorescent liquéfiant de CHAPMEN.....		1	2
Bacille fluorescent liquéfiant HIRBQUELLWASSER..	1,25	1,5	3

Remarque. — En ce qui concerne les concentrations critique, infertilisante et mortelle, j'adopterai les définitions suivantes :

concentration critique = concentration pour laquelle 30 à 50 % des tubes ensemencés n'offrent pas de développement apparent.

concentration infertilisante = concentration pour laquelle tous les tubes restent limpides.

concentration mortelle = concentration pour laquelle les tubes ensemencés restés limpides pendant huit jours et réensemencés sur milieu L₁ ne montrent aucun germe vivant.

L'examen du tableau XXIII montre que pour une concentration en acide phénique de 0.50 0/00 (concentration critique), la végétation est irrégulière. A la concentration de 0.75 0/00 (concentration infertilisante) (1), tous les tubes restent limpides, mais ce n'est que pour une concentration de 2 0/00

(1) L'expression de concentration infertilisante peut être critiquée lorsqu'elle est appliquée à des expériences analogues à celles que nous venons d'effectuer, par contre, elle rend parfaitement compte des faits lorsqu'on ne cherche qu'à déterminer la quantité de substance qui s'oppose à la putréfaction de milieux nutritifs. Je rappellerai à ce propos que J. REGNIER et S. LAMBIN (1931) ont proposé l'expression de *valeur antigénétique* au lieu de pouvoir infertilisant et celle de *valeur antibiotique* en remplacement de pouvoir bactéricide ou microbicide.

(concentration mortelle) que les plastides sont détruites; en effet, après un contact de huit jours dans l'eau peptonée phéniquée à 2 o/oo, les plastides de *B. caryocyaneus* ne se développent pas si on les transporte en milieu synthétique L₁.

Il résulte des faits rapportés dans le tableau XXIV que *B. caryocyaneus* et *B. chlororaphis* offrent sensiblement la même résistance vis-à-vis de l'acide phénique. Par contre, *B. fluorescens albus*, le Bacille fluorescent pathogène pour les plantes, le Bacille fluorescent liquéfiant de CHAPMEN, le Bacille fluorescent liquéfiant HIRBQUELLWASSER, peuvent se multiplier à des concentrations en acide phénique supérieures à celles qui arrêtent le développement de *B. caryocyaneus* ou *B. chlororaphis*. En ce qui concerne le Bacille fluorescent liquéfiant HIRBQUELLWASSER, la concentration mortelle atteint même 3 o/oo. Le Bacille fluorescent pathogène pour les plantes mérite une mention spéciale. Si la dose infertilisante est de 1 o/oo, la dose mortelle ne lui est pas sensiblement supérieure (1), il y a donc là une anomalie à la règle générale que l'on est habitué à observer dans la destruction des germes par la chaleur ou les agents chimiques. On sait que les « zones mortelles » (2) sont généralement précédées d'une zone de variations physiologiques ou morphologiques.

En résumé, *B. caryocyaneus*, *B. chlororaphis*, *B. fluorescens albus*, le Bacille fluorescent pathogène pour les plantes, le Bacille fluorescent liquéfiant de CHAPMEN et le Bacille fluorescent liquéfiant HIRBQUELLWASSER offrent des résistances différentes vis-à-vis de l'acide phénique.

RECHERCHE DES MODIFICATIONS PHYSIOLOGIQUES APPORTÉES PAR LA CULTURE EN MILIEU PHÉNIQUÉ

Depuis les recherches de WASSERZUG (1888), on connaît l'influence des antiseptiques sur le pouvoir chromogène de différentes Bactéries. Or, l'expérience a montré que la fonction chromogène de *B. caryocyaneus* est peu influencée par l'acide phénique; en effet, après huit jours de culture en présence d'acide phénique à des doses convenables, les plastides de *B. caryocyaneus* transportées en milieu L₁ secrètent encore un pig-

(1) G. CREMIEUX (1930) paraît avoir observé des faits du même ordre dans son étude relative à l'action du Bleu de Nil sur le Bacille pyocyannique, le Staphylocoque et le Colibacille (p. 194).

(2) Zones que l'on observe aussi bien dans l'étude de la chaleur que dans l'étude des antiseptiques.

ment fluorescent vert et un pigment bleu. Il en est de même du pouvoir chromogène de *B. chlororaphis*. Les plastides de *B. chlororaphis* provenant de cultures en eau peptonée phéniquée (à 0,50 o/oo, par exemple) et ensemencées sur milieu synthétique L₁ produisent un pigment fluorescent vert et de beaux cristaux verts.

*ACTION DE L'ACIDE PHÉNIQUE
SUR LA FORME DES PLASTIDES
DE QUELQUES BACTÉRIES FLUORESCENTES*

Il ne suffit pas de déterminer les concentrations mortelles ou infertiles pour savoir dans quelle mesure l'acide phénique peut modifier le tableau de la vie des Bactéries. A l'examen macroscopique, il faut adjoindre l'examen microscopique. C'est ce que je ferai dans les lignes suivantes, où je vais exposer l'aspect microscopique des cultures.

I. — ASPECT MORPHOLOGIQUE DE *B. caryocyaneus*

J'envisagerai tout d'abord la forme des plastides de *B. caryocyaneus* cultivé en eau peptonée additionnée de 0 gr. 25 et 0 gr. 50 o/oo d'acide phénique.

1° *Forme de B. caryocyaneus en solution peptonée phéniquée à 0 gr 25 o/oo.* — Dans ce milieu, les germes paraissent relativement peu nombreux lorsqu'on effectue l'examen sur le frais. Les plastides isolées ou réunies par deux sont extrêmement mobiles. Les éléments constituant les diplobacilles paraissent réunis par un plasmodème. Certains de ces éléments sont arrondis, d'autres sont ovalaires, quelques plastides sont plus allongées. Les éléments bactériens montrent en général une capsule très accusée. Dans l'étude du mouvement, il faut considérer les plastides seules et les plastides réunies en diplobacilles. Dans le cas des plastides isolées et coniques animées de mouvement de translation, c'est la partie arrondie qui est dirigée en avant. Lorsque deux plastides coniques réunies entre elles par un pont de cytoplasme se déplacent, elles ne se comportent pas de la même façon. Toutes deux sont évidemment animées de mouvements de translation, mais pour l'une d'elles, ce mouvement se complique d'un mouvement de révolution.

2° *Forme de B. caryocyaneus en solution peptonée phéniquée à 0 gr. 5 o/oo (concentration critique).* — Aux concentrations de 0,5 o/oo, du moins

pour les tubes où on note un développement bactérien, l'examen microscopique sur le frais est assez difficile. En effet, les plastides sont peu nombreuses généralement réunies en diplobacilles et extrêmement mobiles. Tantôt un des éléments du diplobacille est animé de tremblement, l'autre restant au repos, tantôt une plastide décrit de nombreux cônes de révolution, la deuxième plastide étant animée de rares mouvements de révolution. Dans d'autres cas, le mouvement de révolution se combine avec un mouvement de translation et on voit quelquefois les deux éléments, tournant à des vitesses différentes, former des figures de fragment de spire. Ces images peuvent prendre naissance grâce au plasmodème élastique qui unit les deux plastides. Dans les milieux renfermant 0 gr. 50 0/00 d'acide phénique, les plastides bactériennes possèdent une capsule encore plus accusée qu'en milieu peptoné phéniqué à 0 gr. 25 0/00.

A côté des plastides de dimensions normales représentant la majeure partie de la population, on trouve de grandes et de petites plastides. Ces dernières sont si petites qu'elles m'ont conduite à rechercher si elles pouvaient traverser les parois des bougies L³. C'est un point que je développerai dans un autre mémoire ; mais je puis dire dès maintenant que toutes mes tentatives de filtration sur bougie L₃ ont été négatives.

II. — *Aspect morphologique de B. fluorescens albus.*

Cultivé en eau peptonée phéniquée, *B. fluorescens albus* montre de très longs filaments traversant tout le champ microscopique. Les extrémités des plastides sont carrées ou parfois légèrement concaves. Les éléments bactériens sont entourés d'une gaine, cette espèce microbienne se rapproche donc de la Bactéridie de DAVAINÉ, du Bacille du Charbon, et l'on conçoit que de telles images aient fait rapprocher les Bactéries des Algues.

III. — *Aspect morphologique de B. chlororaphis.*

Ainsi qu'on vient de le voir, *B. chlororaphis* offre les mêmes concentrations critique, infertilisante et mortelle que *B. caryocyaneus*. Il y a plus, lorsqu'on examine comparativement, entre lame et lamelle, des cultures sur milieu phéniqué (âgées de 9 jours) de *B. chlororaphis* et de *B. caryocyaneus*, on observe dans les deux cas des images sensiblement identiques. Les deux espèces bactériennes offrent la même mobilité, le même genre de mouvement, les mêmes variations de forme.

La représentation dans l'espace des plastides bactériennes en milieu phéniqué ne présente aucune difficulté. On voit très bien que la plastide n'est

ni triangulaire, ni rectangulaire, mais conique ou cylindrique (1), suivant les plastides considérées.

En résumé, l'acide phénique, à des concentrations inférieures à 0,5 o/oo, ne s'oppose nullement au développement de *B. caryocyaneus* en eau peptonée. Dans ce milieu, la dose infertilisante est de 0,75 o/oo, et la concentration mortelle atteint 2 gr. o/oo. Pour les concentrations compatibles avec la vie des plastides, l'acide phénique provoque des modifications morphologiques assez peu étendues; et il ne semble pas que le phénol puisse déterminer des modifications physiologiques sensibles chez *B. caryocyaneus*.

BIBLIOGRAPHIE

- BIDZINSKI (S.). — *Thèse Pharmacie*, Nancy, 1926.
KROENIG et PAUL. — *Zeitsch. f. Hyg.*, T. XXV, p. 1, 1897.
MADSEN (Th.) et NYMAN (M.). — *Zeitschr f. Hyg. u. Infekkt.*, Bd. 57, p. 388-404, 1907.
MIQUEL (P.). — *Annuaire de l'Observatoire de Montsouris*, p. 562, 1884 ; *Ann. de Micrographic*, p. 528, 1894.
RÉGNIER (J.) et LAMBIN (S.). — *Bull. Acad. Médecine*, T. CV, n° 11, 10 pages (tirage à part), 1931.
RIDEAL (S.) et WALKER (J.-T.-A.). — *Approved technique of the Rideal-Walker Test*; H. K. Lewis and C°, Londres, 1921.
SEPPANEN (A.). — *Finnischen Litteratur-Gesellsch.*, Helsinki, p. 88-134, 1931.
STERNBERG. — *Amer. Jour. Med. Sc.*, T. LXXXIV, p. 320, 1883.
TILLEY (F.-W) et SCHAFER (J.-M.). — *Journ. of agric. research.*, Vol. 43, n° 7, p. 611-617, 1931.
THIRY (G.). — *C. R. Soc. biol.*, T. LXXIV, p. 651-652, 1913.
VLÈS (F.). — *Précis de chimie physique*; Vigot, Paris, p. 347, 1929.
WALKER (J.-T.-A.) et WEISS (J.-M.). — *Communication à l'Institut Franklin, The Medical Officer*, 12 mai 1929.

(1) La notion de relief chez les microorganismes n'est pas toujours facile à percevoir. Lorsqu'on étudie les dimensions des Bacilles, c'est-à-dire des Bactéries en bâtonnets, on parle généralement de longueur et de largeur des plastides comme si la Bactérie pouvait se ramener à un rectangle, ce qui conduirait à considérer les microbes comme des êtres à deux dimensions. On sait que cette image tient à ce que l'on observe la projection de la plastide et non la plastide elle-même. En effet, il suffit de s'adresser à du matériel convenable et d'opérer dans certaines conditions pour que la sensation de relief apparaisse et que les microorganismes puissent être considérés comme des êtres à trois dimensions. Dans le cas de *B. caryocyaneus*, après coloration (vitale) par le Rouge neutre, l'examen microscopique montre des plastides dont la coloration va en décroissant de la base au sommet de l'élément. On a donc bien affaire à un cône et non à un triangle. De même lorsqu'on examine, entre lame et lamelle, certains *Cryptococcus* après coloration, seuls certains grains sont colorés et si la préparation offre une épaisseur suffisante, les cellules tournent autour d'un diamètre et montrent successivement à l'œil les différents points colorés.

**Culture de *B. caryocyaneus*
en présence de matières colorantes
considérées comme antiseptiques**

STILLING (1890) paraît avoir constaté le premier l'action bactéricide du Violet de méthyle. Depuis cette observation, un nombre considérable de publications montrent les propriétés microbicides de certaines substances colorantes. Tout le monde connaît l'emploi des « *couleurs d'aniline* » dans la préparation des milieux électifs destinés à l'isolement du Bacille tuberculeux et du Bacille typhique.

Ayant surtout pour but d'esquisser le tableau de la vie de *B. caryocyaneus* dans des conditions variées, mon attention a été particulièrement attirée par les recherches de TRAUBE (1912), WRIGHT (1917), GRAHAM SMITH (1919), BROWNING, GULBRANSEN et KENNAWAY (1919-1920), FLEISCHER et AMSTER (1923) A.-E. STEARN et E.-W. STEARN (1924), EGGERTH (1926), HOLLANDE et CRÉMIEUX (1928), SERRA (1) (1932)...

RECHERCHES PERSONNELLES

TECHNIQUE

Dans ces recherches (2), j'ai adopté une technique calquée sur celle que j'ai décrite à propos de l'étude du pouvoir antiseptique de l'acide phénique. Je me bornerai donc à indiquer un type de protocole d'expérience schématisé dans le tableau ci-dessous :

TABLEAU XXV

DÉSIGNA- TION des tubes	SOLUTION peptonée à 2,5 % de pH = 7	SOLUTION COLORANTE	SUSPENSION BACTÉRIENNE	DILUTION FINALE du colorant dans le système
<i>a</i>	4 cm ³ 75	0 cm ³ 25 à 5 %	1 cm ³	1/480
<i>b</i>	4,8	0,2 à 5 %	1	1/600
<i>c</i>	4,8	0,2 à 4,68 %	1	1/650
<i>d</i>	4,8	0,2 à 4,37 %	1	1/700
<i>e</i>	4,8	0,2 à 4 %	1	1/750
<i>f</i>	4,8	0,2 à 3,75 %	1	1/800
T	5 cm ³	0	1	

(1) *Thèse Sciences*, Nancy, 1932.

(2) Ces essais ont été effectués en collaboration avec J. SERRA.

Suivant les essais, on fait varier la concentration des solutions colorantes et on étend ainsi la zone de dilution.

Les matières colorantes utilisées dans ces expériences sont l'Erythro-sine et le sulfate de Bleu de Nil. Ce dernier colorant a été préparé par J. SERRA. Dans ce cas particulier, il n'y a donc pas à redouter les impuretés si fréquentes dans les colorants commerciaux. Cette cause d'erreur étant éliminée, d'autres persistent néanmoins, c'est ainsi que le pouvoir tinctorial et le pouvoir bactéricide d'une solution colorante varient avec l'âge de la solution.

La suspension microbienne ajoutée aux systèmes offre une concentration de 90 millions de germes au centimètre cube. La concentration finale des systèmes en Bactéries est donc de 15 millions de germes au cm_3 .

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

I. — ESSAIS EFFECTUÉS EN EAU PEPTONÉE ADDITIONNÉE DE BLEU DE NIL.

Concentration critique, concentration infertilisante, concentration mortelle. — Si on envisage la multiplication ou la végétation de *B. caryocyanus*, on constate qu'il existe une concentration (concentration critique) pour laquelle les Bactéries cessent de se développer, dans 30 à 50 % des tubes. Cette végétation irrégulière s'observe lorsque la teneur en colorant du milieu nutritif atteint 0 gr. 208 % (dilution 1/480) (1). La concentration infertilisante est de l'ordre de 0 gr. 250 % (dilution 1/400) et la concentration mortelle (2) est voisine de 0 gr. 500 % (dilution 1/200), lorsque le temps de contact avec le Bleu de Nil est de six jours.

Réduction du colorant. — Le développement d'une Bactérie aussi avide d'oxygène que *B. caryocyanus* devait à priori déterminer une réduction du colorant dans la solution peptonée additionnée de sulfate de Bleu de Nil. C'est du moins ce qui semblait découler des observations de SPINA (1887), GASSER (1890), LESBRE et JANSION (1926), LUNDQUIST et RYLANDER (1926), QUASTEL (1928), BRAUN et ses Collaborateurs et c'est ce que l'expérience vérifie. Après 48 heures de culture, on note une décoloration dans les zones de concentration variant de 0 gr. 153 % à

(1) Les bactériologistes expriment volontiers leurs résultats en fonction de la dilution. Je fais donc suivre l'indication de la concentration de la valeur de la dilution.

(2) La concentration mortelle a été déterminée comme dans l'exemple de l'acide phénique, c'est-à-dire en transportant, en milieu synthétique L_1 , les plastides ayant séjourné dans le milieu coloré.

0 gr. 133 % (de la dilution 1/650 à la dilution 1/750). Après quatre jours, la décoloration s'étend de la concentration 0 gr. 166 % à la concentration de 0 gr. 050 % (de la dilution 1/600 à la dilution 1/2000). Cette décoloration est bien une réduction et non une précipitation (1) de la matière colorante. Le voile, bleu à la partie supérieure qui est en contact avec l'air, est décoloré à la partie inférieure qui flotte sur la colonne liquide. Il suffit de prélever avec une pipette du liquide décoloré et de le déposer dans un tube à essai pour que cette opération de transvasement fasse réapparaître la coloration bleue.

Variations morphologiques. — L'examen macroscopique des cultures de *B. caryocyaneus* effectuées en présence de Bleu de Nil doit être complété par l'examen microscopique. Ce dernier montre tout d'abord une diminution du nombre des germes allant en croissant des faibles aux fortes concentrations. On note aussi la prédominance des formes ovalaires ou arrondies aux fortes concentrations. Au contraire, les formes en bâtonnets constituent la majorité de la population pour les zones de teneur moyenne en colorant.

Pour des concentrations convenables en matière colorante, la plastide peut offrir un aspect alvéolaire. A la concentration de 0 gr. 166 % (dilution 1/600) les plastides montrent une grande vacuole à l'intérieur de laquelle on aperçoit un grain chromatique bleu foncé.

Pour certains auteurs, les colorations vitales n'existent pas. Les éléments colorables par une solution aqueuse de colorant sont morts au moment où ce dernier pénètre dans l'élément anatomique (BEAUCHAMP). Il ne m'appartient pas de rechercher si cette conception est ou n'est pas fondée en ce qui concerne les animaux et les végétaux supérieurs; mais je puis affirmer que l'on peut colorer des plastides bactériennes, et cela d'une façon assez intense, par un colorant convenable, sans avoir tué la Bactérie. Les mouvements de translation, de rotation, qu'il est impossible de confondre avec le mouvement brownien, démontrent surabondamment que l'élément bactérien est vivant. Les plastides mortes offrent beaucoup moins de résistance à la pénétration du colorant que les plastides vivantes. Les plastides mortes se colorent donc d'une façon plus rapide et plus intense que les Bactéries vivantes. Par suite, on observe un nombre croissant d'éléments colorés lorsqu'on passe des faibles aux fortes concentrations en colorant.

(1) Précipitation qui s'observe si souvent dans des milieux nutritifs additionnés de matière colorante.

Si aux faibles concentrations, les plastides sont incolores, aux fortes concentrations, elles se teignent d'une façon trop intense et partant trop uniforme pour mettre en évidence des détails de structure. C'est seulement pour les concentrations moyennes que la culture en milieu coloré fait apparaître une structure chez la plastide bactérienne.

C'est ce qui découle d'ailleurs de l'examen du tableau suivant :

TABLEAU XXVI

DILUTION du Bleu de Nil dans la culture —	FORME DES PLASTIDES	POURCENTAGE des plastides colorées —	ASPECT DES PLASTIDES —
	MOTILITÉ		
1/800	forme sensiblement normale; motilité normale; développement. abondant.	peu ou pas de plastides colorées	
1/650	forme bacillaire.	2-3	capsule très nette; le cytoplasme n'est pas coloré.
1/600	tendance au raccourcissement; plastides agglutinées.	10-15	aspect vacuolaire; présence de grains colorés en bleu; assez fréquemment on observe un grain volumineux coloré en bleu, ce grain est situé dans une vacuole.
1/480	les plastides paraissent immobiles; agglomération fréquente des éléments.	60-70	vacuoles; grains ou masses plus importantes colorées en bleu; plasmodème.

Il est intéressant de comparer la résistance de *B. caryocyanus* au sulfate de Bleu de Nil avec la résistance de Bactéries fluorescentes voisines. Les essais effectués dans cet ordre d'idées sont résumés dans le tableau ci-dessous :

TABLEAU XXVII

DÉSIGNATION DES ESPÈCES BACTÉRIENNES EXPÉRIMENTÉES	CONCENTRA- TION CRITIQUE exprimée en gr. %	CONCENTRA- TION INFERTILI- SANTE exprimée en gr. %	CONCENTRA- TION MORTELE exprimée en gr. %
<i>B. cyanogenus</i>	0,142	0,166	0,208
Bacille fluorescent liquéfiant de CHAPMEN.....		0,166	0,208
<i>B. fluorescens aureus</i>			0,125
<i>B. fluorescens albus</i>			≤ 0,121
Bacille fluorescent pathogène pour les plantes.....			≤ 0,125
Bacille fluorescent liquéfiant HIRBQUELLWASSER	0,166	0,200	≤ 0,250
<i>B. caryocyaneus</i>	0,208	0,250	0,500

Dans les mêmes conditions d'expérience, les Bactéries expérimentées réagissent donc de diverses façons en présence de Bleu de Nil. Ces différences de réaction sont surtout sensibles pour *B. caryocyaneus* (concentration mortelle : 0 gr. 500 %) et pour *B. fluorescens albus* (concentration mortelle : 0 gr. 121 %).

II. — ESSAIS EFFECTUÉS EN FAU PEPTONÉE ADDITIONNÉE D'ÉRYTHROSINE

Les expériences destinées à mettre en évidence l'action de l'Erythrosine sur *B. caryocyaneus* en solution peptonée ont été établies de la façon suivante : des solutions peptonées à 2, 5 % (de pH = 7) ont été additionnées de doses croissantes de matière colorante. Les essais ont porté sur des zones de concentration de 0 gr. 238 % à 2 gr. 500 % (de la dilution 1/420 à la dilution 1/40). Dans ces conditions d'expérience, on constate que *B. caryocyaneus* se développe d'une façon sensiblement normale, même dans les milieux renfermant 2 gr. 500 % d'Erythrosine.

En ce qui concerne la végétation, l'Erythrosine a donc peu d'action sur *B. caryocyaneus*.

Examinons maintenant si l'Erythrosine peut déterminer des modifications morphologiques et faire apparaître une structure chez *B. caryocyaneus*. On constate que le nombre des plastides colorées croît avec la concentra-

tion des systèmes en matière colorante, sans toutefois jamais atteindre 25 % des éléments. A la concentration de 2 gr. 500 % les plastides paraissent légèrement allongées. De plus, on constate la présence d'une auréole très perceptible autour de chaque plastide. Cette auréole est légèrement rosée, même avec un fort éclairage. Enfin on perçoit distinctement l'aspect vacuolaire des Bactéries; le cytoplasme est repoussé contre les parois de l'élément et forme soit deux calottes polaires, soit une couche pariétale très mince. Enfin l'Erythrosine met en évidence l'existence d'un plasmodème, coloré en rose, reliant les deux éléments des diplobacilles. Cette formation n'est pas un artifice de préparation, elle correspond bien à l'image que l'examen microscopique approfondi donne de la plastide vivante non colorée.

Il résulte de ces essais que :

1° le pouvoir antiseptique des matières colorantes étudiées varie avec les espèces bactériennes envisagées;

2° en ce qui concerne *B. caryocyaneus*, le Bleu de Nil (sulfate) s'est révélé comme un antiseptique assez puissant et l'Erythrosine comme une substance ayant peu d'influence sur la vie du germe isolé par BEIJERINCK;

3° la culture en milieu coloré révèle l'existence de détails de structure extrêmement intéressants.

BIBLIOGRAPHIE

- BOHN (G.) et DRZEWINA (A.). — *C. R. Soc. biol.*, T. LXXXIX, p. 386-388, 1923.
CHURCHMAN. — *Journ. Exp. Med.*, t. XVI, p. 221, 1912; t. XVII, p. 373, 1912.
T. XXXVIII, p. 1-7, 1923.
CRÉMIEUX (G.). — *Thèse Pharmacie*, Montpellier, 1930.
DOLADILHE (M.). — *Thèse Sciences*, Dijon, 1931.
EGGERTH (A.). — *Journ. of infect. dis.*, T. 38, p. 440, 1926.
FLEISCHER et AMSTER. — *Zeitschrift. f. Imm.*, Abt. I, Orig., Bd 37, p. 327, 1923.
GUILLIERMOND (A.). — *C. R. Soc. biol.*, T. CIV, p. 468-472, 1930.
HOLLANDE (A.-Ch.) et CRÉMIEUX (G.). — *C. R. Soc. biol.*, T. XCIX, p. 542-544, 1928.
LASSEUR (Ph.) et SERRA (J.). — *Trav. du Laborat. Microbiol.* Faculté de Pharmacie, Nancy, fasc. IV, p. 133-136, 1931.
LOMME (J.). — *C. R. Soc. biol.*, T. XCV, p. 713, 1926.
MIQUEL (P.) et CAMBIER (R.). — *Traité de Bactériologie*, Naud, Paris, p. 87, 1902.

- QUASTEL (J.-H.). — *Ann. Brasserie et Dist.*, T. XXVII, n° 9, p. 129, 1928.
SERRA (J.). — *Bull. Assoc. Diplômés Microbiol.*, Faculté Pharmacie Nancy, n° 2, 1931; *Thèse Sciences*, 170 pages, Nancy, 1932.
SMITH (G.). — *Journ. of Hyg.*, T. 18, p. 1, 1919.
SPINA (A.). — *Centralbl. f. Bakt., Orig.*, Bd II, p. 71, 1887.
STEARNS et STEARNS. — *Journ. of Bact.*, vol. IX, p. 463-477, 479-489, 491-510, 1924.
STILLING. — *Berlin. Klin. Wochenschr.*, p. 531, 1890.
WIESNER (B.). — *C. R. Soc. biol.*, T. xcv, p. 418-419, 1926.
WRIGHT (J.-H.). — *Journ. of Bact.*, vol. 2, p. 315, 1917.

Action du sulfocyanure de potassium sur les suspensions de *B. caryocyaneus*

L'action du sulfocyanure de potassium sur les Bactéries est connue depuis les travaux de FLORIAN (1889), MARINETTI (1896), HUGENSCHMIDT (1896), etc..., mais BOAS (1927) a repris ces recherches au point de vue physico-chimique et il est arrivé à la découverte de l'action sélective de l'ion SCN—. Notre attention fut attirée sur les recherches de BOAS par les belles publications de KÖNIG (1).

Dans une culture mixte de Bactéries et de Champignons, il est possible de faire dominer l'un ou l'autre des éléments microbiens par addition d'ions convénables au milieu nutritif, c'est l'action sélective ou phénomène phylétique de BOAS. Pour expliquer l'action spécifique de l'ion SCN—, BOAS fait intervenir des phénomènes d'hydratation et de gonflement que nous n'avons pas eu l'occasion de constater, mais la possibilité de ces phénomènes (hydratation et gonflement) reste évidemment entière pour d'autres conditions d'expériences. Néanmoins, l'action sélective de l'ion SCN— pouvant s'observer en l'absence de tout gonflement, du moins chez *B. caryocyaneus* et *Endomyces albicans*, le phénomène d'hydratation ne saurait être placé à la base d'une théorie générale du phénomène de BOAS. Ainsi que cela ressort des expériences publiées en collaboration avec Ph. LASSEUR et L. GEORGES (2).

L'action du sulfocyanure de potassium sur les suspensions microbiennes a été étudiée d'une façon plus approfondie par mon excellente compagne, Mlle L. GEORGES (Thèse du Laboratoire de M. LASSEUR).

(1) Saluons en passant la noble figure de KÖNIG, médecin français aussi modeste que savant. Dans ce siècle qui adore le métal, il est bon de souligner le désintéressement chaque fois qu'on le rencontre.

(2) *Travaux du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy*, fasc. V, p. 83-109, 1932.

Pouvoir bactéricide de l'argent métallique

En collaboration avec Ph. LASSEUR, M. PIERRET et C. MAGUITOT (1932), j'ai étudié le pouvoir microbicide de l'argent métallique sur différentes Bactéries. Ne pouvant entrer dans de longs détails, je résumerai l'action bactéricide de l'argent sur *B. caryocyaneus* (1).

Auparavant, je rappellerai les novateurs, ceux qui, par leurs recherches, ont établi le pouvoir microbicide de l'argent, j'ai nommé : RAULIN, NAEGELI et VINCENT.

HISTORIQUE

Aperçu par RAULIN (1870), étudié par NAEGELI (1893), VINCENT (1895), le pouvoir microbicide de l'argent est aujourd'hui admis par l'immense majorité des chercheurs. Les opinions ne sont partagées que sur l'interprétation du mécanisme du phénomène.

Après avoir signalé l'action toxique de l'argent sur *Aspergillus niger*, RAULIN (1870) n'attacha pas d'autre importance à une observation accidentelle. Tel ne fut pas le cas de NAEGELI (1893) et de VINCENT (1895) qui étudièrent longuement le pouvoir antiseptique des pièces métalliques d'argent et de cuivre.

Dans les expériences de NAEGELI, l'eau mise en contact avec l'argent métallique acquiert des propriétés toxiques qui persistent après l'enlèvement de la masse métallique. Pour l'auteur, les Spirogyres détruites par l'eau oligodynamique offrent un aspect différent de celui que présentent les mêmes cellules traitées par un poison quelconque. Aussi l'éminent biologiste propose-t-il l'expression d' « *action oligodynamique* ». Il atténue ou supprime l'action oligodynamique de l'eau en ajoutant à cette dernière des substances diverses telles que du soufre, de la suie, de la farine, de la gomme, de la dextrine. Il montre de même que les cellules de Spirogyres en quantité suffisante annihilent l'action oligodynamique de l'eau. NAEGELI montre que le verre lui-même peut acquérir des propriétés oligodynamiques s'il a été au contact de pièces métalliques.

Si l'on tient à l'expression de pouvoir bactéricide, VINCENT (1895) est incontestablement l'auteur qui, le premier, a signalé le pouvoir nocif de l'argent pour les Bactéries et même en généralisant à tous les microbes,

(1) Le lecteur que la question intéresse trouvera des renseignements complémentaires dans le Fascicule V des *Travaux du Laboratoire de Microbiologie*, p. 13-55, 1932.

VINCENT reste l'auteur qui, le premier, a étudié systématiquement le pouvoir antiseptique de l'argent métallique. Le célèbre savant français montre que dans un milieu nutritif où l'on a préalablement déposé des pièces d'argent ou de bronze, la culture du Bacille pyocyanique, du Colibacille, du Vibron cholérique, du Streptocoque est extrêmement faible ou nulle. De même, des gouttes de cultures pathogènes, de pus, de salive, déposées à la surface de pièces métalliques perdent leur vitalité et sont détruites plus ou moins rapidement.

Les recherches du savant biologiste français établissent donc d'une façon irréfutable le pouvoir antiseptique des pièces de monnaie.

Cependant, dans les expériences de CODUR (1905), G. THIRY et CODUR (1913), SAUTON (1913), CLÉMENT (1913), l'action microbicide des pièces d'argent est irrégulière. Cela tient à ce que la destruction des germes par les métaux est sous la dépendance de nombreux facteurs. C'est ainsi que le pouvoir microbicide de l'argent peut, en effet, être annihilé par des causes variées : contact avec des corps adsorbants divers (NAEGELI, 1893; KLING, 1932), des solutions colloïdales (NAEGELI, 1893), « *chauffage au rouge, ébullitions répétées dans l'eau distillée, inclusion de plusieurs jours dans la gelée d'agar* ». (DOERR, 1920), contact de certains métaux (étain) (DRZEWINA et BOHN, 1926), séjour dans l'eau courante, traitement par l'hydrogène sulfuré (KLING, 1932), par l'ammoniaque et même par l'acide azotique (J. CARNEIRO FELIPPE et THALES MARTIS, 1927), etc... Par contre, l'argent inactivé peut retrouver en partie ou en totalité ses propriétés antiseptiques après avoir été soumis à un traitement approprié : séjour dans les acides très dilués et très dissociés (DOERR, 1920), dans l'air atmosphérique (DRZEWINA et BOHN, 1926), dans une atmosphère très oxydantes (DOERR, 1922), chauffage « *à une température supérieure à 80° pendant une heure ou deux* » (CARNEIRO FELIPPE et THALES MARTIS, 1927), contact avec une lame d'argent active (DRZEWINA et BOHN, 1926).

Ces derniers savants montrent que la destruction de *Convoluta* est considérablement augmentée par l'action de la lumière.

Dans les recherches qui utilisent une grande surface active (lames d'argent) l'action bactéricide se manifeste dans un temps très court (M. et Mme BOHN, 1927-1931; M. et Mme WOLLMANN, 1930; STERN, 1931). La sensibilité des germes à l'action nocive de l'argent varie avec l'espèce et pour une même espèce avec le stade d'évolution de l'organisme considéré (A. DRZEWINA et G. BOHN, 1927) et la concentration du système en cellules vivantes (NAEGELI, 1893; LAUBENHEIMER, 1921).

Si le pouvoir bactéricide de l'argent est aujourd'hui admis par la ma-

majorité des auteurs, les opinions sont partagées en ce qui concerne l'interprétation du mécanisme de ces phénomènes et les différentes hypothèses émises pour expliquer le mécanisme de l'action bactéricide de l'argent peuvent se ramener à deux groupes : hypothèses chimiques, hypothèses physiques.

HYPOTHESES CHIMIQUES

RAULIN (1870), VINCENT (1895), SAUTON (1913), LÖHNER (1919) SALUS (1930), DOERR (1920-1922), LAUBENHEIMER (1921), SORDELLI et WERNICKE (1921), SCHUMACHER (1923), WERNICKE, DORTZENBASCH et de la BARRERA (1927), WERNICKE et MODERN (1928), KLING (1932) sont partisans de la théorie chimique. Mais afin de préciser le mécanisme d'action, certains auteurs invoquent l'ionisation (SALUS, 1919; WERNICKE et MODERN, 1928; SCHUMACHER, 1923; HERZBERG, 1923), la formation de complexes d'ions (SPIRO, 1915), la dissolution et la diffusion LÖHNER, 1919), la dissolution (1) (SORDELLI et WERNICKE, 1921; WERNICKE et MODERN, 1928). Si l'action bactéricide de l'argent est imputable à la solubilisation du métal, on doit obtenir des résultats du même ordre en s'adressant à des sels d'argent pratiquement insolubles, c'est-à-dire offrant une solubilité de l'ordre de $1,10^{-17}$ à $2,10^{-4}$. C'est ce que l'expérience vérifie dans les essais de BECHHOLD (1919).

Pour de nombreux auteurs, le pouvoir bactéricide de l'argent ne peut se manifester qu'en présence d'oxygène, aussi HERZBERG (1923) propose-t-il une théorie qui s'appuie sur l'activation des molécules d'oxygène. SCHUMACHER considère les métaux comme des porteurs d'oxygène. Pour KLING (1932), au contraire, la solubilisation de l'argent « *ne nécessite pas l'intervention d'oxygène* ».

Dans la conception de SAXL (1927) on retrouve une hypothèse intermédiaire entre les hypothèses chimiques et physiques et qui lie la dissolution des métaux à l'apparition de phénomènes électriques.

HYPOTHESES PHYSIQUES

LÖHNER (1919) pense que l'on pourrait peut-être expliquer le pouvoir bactéricide de l'argent par l'action de radiations.

SPIRO (1915), SAXL (1917), DRZEWINA et BOHN (1926) se demandent si

(1) La solubilisation des métaux dans l'eau ayant été en contact avec des pièces métalliques a été observée par NAEGELI (1893), VINCENT (1895), WERNICKE et ses collaborateurs (1928), KLING (1932). Il a été possible de caractériser non seulement le cuivre, mais encore l'argent dans l'eau devenue microbicide.

on ne peut faire intervenir un phénomène électrique pour tenter l'interprétation de l'action microbicide de l'argent.

Pour d'autres auteurs (NAEGELI, 1893; SAXL, 1917; DRZEWINA et BOHN, 1926) le pouvoir bactéricide de l'argent métallique pourrait être ramené à une action de surface.

Enfin en 1929, LAKHOVSKY (1) conclut que « *l'action bactéricide du métal est purement physique et due à l'altération du noyau en contact direct avec le métal* » (p. 1069).

DIENERT et ETRILLARD (1931) reprennent les expériences de LAKHOVSKY et devant leurs résultats plusieurs fois confirmés refusent d' « *admettre l'explication physique de M. LAKHOVSKY, c'est-à-dire que les spires du métal altèrent la fréquence de l'oscillation cellulaire, supposée exister dans l'intérieur des cellules, par cet auteur* ».

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Je n'insisterai pas sur la technique utilisée dans ces recherches, elle a été décrite avec d'amples détails dans le fascicule V des Travaux du Laboratoire, de plus, le dispositif de numération est le même que celui qui a été employé dans les expériences relatives à l'influence de la chaleur sur *B. caryocyaneus*. La Planche II, page 74 représente cet appareil.

J'indiquerai tout d'abord quelques essais établissant le pouvoir toxique de l'argent métallique pour *B. caryocyaneus*.

(1) A la suite de notre note à l'Académie des Sciences, M. LAKHOVSKY a fait paraître dans les Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, une note dans laquelle il nous objecte (p. 1206) « *qu'un circuit ne peut osciller que s'il est électriquement isolé, ce qui ne peut être le cas pour des circuits en fil métallique nu, en contact avec de l'eau ou un liquide conducteur* ». Cette objection est sans valeur. « *Il serait trop long, en effet, d'énumérer tous les auteurs qui ont mesuré la constante diélectrique de l'eau en étudiant la propagation d'ondes amorties ou entretenues le long de 2 fils de LECHER (méthode de DRUDE), immergées dans l'eau, par conséquent en utilisant la résonance de la portion du circuit immergé. La même méthode a été employée pour mesurer la constante diélectrique de solutions diluées d'électrolytes.* » (PIERRET). D'ailleurs, dans une note additionnelle au mémoire que nous avons publié sur le pouvoir bactéricide de l'argent, M. PIERRET a montré la résonance d'un circuit oscillant plongé dans un liquide par une expérience simple à laquelle nous renvoyons le lecteur. (*Travaux du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie, Fasc. V, 1932*).

TABLEAU XXVIII

DÉSIGNATION DES SOUCHES utilisées	NOMBRE DE GERMES CONTENUS DANS 1 cm ³ DE SUSPENSION	
	Suspension + argent contact 24 heures	Suspension témoin
A	0	2.400.000.000
B	0	174.200.000
C	0	4.500.600
D	307.401	30.984.601.890

Après de nombreux auteurs [RAULIN (1870), VINCENT (1895), BECHHOLD (1919), NADSON (1931), KLING (1932)], nous constatons que l'argent métallique possède un pouvoir bactéricide indéniable, mais cette action varie avec les conditions d'expérience et notamment avec le temps de contact, la concentration de la suspension et surtout la forme du dispositif métallique. Cette dernière constatation nous a conduits à penser que les différences observées étaient probablement en relation avec la répartition du métal dans la suspension microbienne. C'est pourquoi nous avons institué de nouvelles séries d'essais. Avec 20 cm. de fil d'argent nous avons réalisé des dispositifs variés :

1) Ce sont tout d'abord des filaments rectilignes, soit fixés autour d'une baguette de verre (A) soit réunis par leur base à l'aide d'un fil de soie.

2) Le fil est enroulé en hélice de hauteur variable (B et G) ou en spires de diamètres différents.

3) Le fil forme une double ligne brisée définissant deux plans perpendiculaires (C).

4) Le fil est plié de façon à éviter toute spire suivant 3 plans perpendiculaires (D, E, F) ces dispositifs assurent une répartition du métal aussi uniforme que possible. Cette répartition est meilleure en E et F qu'en D.

Le tableau suivant indique quelques-uns des résultats obtenus.

TABLEAU XXIX

Influence de la forme du circuit dans la destruction de
B. caryocyaneus par l'argent métallique.

DÉSIGNATION des dispositifs utilisés	NOMBRE DE GERMES RENFERMÉS DANS 1 cm ³ DE SUSPENSION APRÈS 6 HEURES DE CONTACT	
	Série A	Série B
Expérience N° 1 :		
A	50.000.000	409.400
G	807.840	121.200
Témoin	10.500.000.000	62.606.000
Expérience N° 2 :		
B	3.950.000	5.069.100
C	988.500	
D	3.915.000	
E	500.000	
F	513.000	
G	919.000	863.100
Témoin	45.108.000	62.606.000

Dans l'expérience n° 1 le pouvoir bactéricide de l'argent employé sous forme d'hélice (dispositif G) est supérieur à celui de l'argent découpé en filaments rectilignes (dispositif A). Il est à noter cependant que ces différences d'action ne s'observent que pour des temps de contact assez courts, variant de 2 heures à 7 heures.

Lorsque le contact se prolonge, l'action bactéricide des deux systèmes est du même ordre.

Dans l'expérience n° 2, le dispositif G ne jouit pas de propriétés bactéricides plus élevées que celles des dispositifs à parties rectilignes. Il y a plus, le circuit B possède le même nombre de spires, la même masse métallique et la même surface d'action que le circuit G, mais en raison de sa faible hauteur, il n'atteint pas la partie supérieure de la colonne liquide. Or, le circuit B détruit un nombre de Bactéries beaucoup plus faible que le circuit G.

En résumé, l'identité des pouvoirs bactéricides des dispositifs C, E, F, G, prouve que la forme du circuit employé ne joue aucun rôle dans les phénomènes considérés. Les différences d'action entre ces dispositifs et les dis-

positifs A, B et D semblent tenir à une inégale répartition du métal au sein du liquide dispersif.

*
**

En résumé, l'action bactéricide de l'argent pourrait s'expliquer par plusieurs processus simultanés ou successifs :

1° fixation des plastides bactériennes à la surface de l'argent (phénomène si bien étudié par BECHHOLD (1914 et 1917) ; mais ce mode d'appauvrissement de la suspension bactérienne ne doit cependant jouer qu'un rôle très restreint dans nos essais.

2° solubilisation du métal ainsi que cela s'observe dans les expériences de DOERR (1920), WERNICKE et MODERN (1928), KLING (1932). Mais comment expliquer dans ce processus la neutralisation respective du pouvoir toxique de l'argent et du cuivre par l'étain et l'aluminium.

Pour DRZEWINA et BOHN cette action « *antagoniste de l'étain vis-à-vis de l'argent peut être comparée à celle bien connue de K et de Ca, l'un neutralisant l'autre* ». Cette hypothèse vraisemblablement exacte soulève immédiatement une difficulté : la neutralisation du pouvoir toxique de l'argent et du cuivre est réalisée par des métaux qui ont la réputation de se laisser difficilement attaquer par l'eau ou du moins d'y former assez difficilement des ions (1).

On pourrait peut-être expliquer cette action par l'existence de différences de potentiel qui peuvent se produire entre l'argent et l'étain dans certaines conditions expérimentales et influencer sur la production et la diffusion des ions Ag^+ .

En effet, une lame d'argent et une lame d'étain plongées dans de l'eau de fontaine présentent une différence de potentiel de l'ordre 0,3 à 0,5 volt. variable d'ailleurs suivant l'eau employée.

Les conditions dans lesquelles ont été faites les expériences de DRZEWINA et BOHN ne sont pas suffisamment précisées pour pouvoir en tirer une conclusion à ce sujet et de nouvelles expériences sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse.

Si l'on s'en tient au processus de solubilisation du métal, peut-on expliquer la mort des Bactéries par des traces aussi faibles de substances métalliques ? Oui, si l'on veut bien mettre les phénomènes catalytiques à la base

(1) L'emploi de tube réfrigérant en étain pour la préparation de l'eau de conductibilité spécifique de l'ordre de $K = 1.10^{-7}$, la conservation dans les vases en aluminium de l'eau de conductibilité de l'ordre de $K = 1.10^{-8}$ semble bien montrer que ces métaux sont bien faiblement attaqués par l'eau.

de la vie des Bactéries. Cette « *pétition de principe* » ne soulève actuellement aucune difficulté grave, car on connaît le rôle capital de traces de métaux sur la croissance, la végétation, la chromogénèse d'un grand nombre de Bactéries. On sait aussi que des traces de substances peuvent annihiler les effets catalytiques de certains métaux, du fer par exemple.

Certes on éprouverait plus de difficulté à expliquer la mort des Bactéries par la faible quantité d'argent dissous si l'on s'en tenait au schéma simplifié qui attribue la mort des Bactéries à la coagulation du cytoplasme ou à la peptisation de la plastide.

En réalité, pour qu'il y ait mort, il faut que la coagulation soit irréversible. Ainsi, la plasmolyse (qui peut être considérée comme une coagulation réversible) ne détermine la mort de la Bactérie que si elle a été trop brusque (1) et non suivie de déplasmolyse. De même, l'hydratation brutale due aux ions OH— provoque la peptisation, la dissolution des plastides bactériennes (2), tandis que l'hydratation due aux substances tensio-actives (taurocholate, glycocholate) n'amène la mort des Bactéries que si leur action est suffisamment prolongée. On pourrait multiplier les exemples de ce genre et montrer que la mort peut être réalisée par des processus bien différents.

BIBLIOGRAPHIE

Pour la bibliographie de cette question, je renvoie le lecteur à l'article publié dans les Travaux du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy, Fasc. V, p. 53, 1932.

A cette énumération de publications, il convient d'ajouter les remarquables recherches de BECHHOLD, dont j'indique ci-dessous les index bibliographiques.

BECHHOLD (H.). — *Zeitschr. f. Hyg.*, Bd. 77, p. 436-459, 1914; *Kolloid. Zeitsch.*, Bd. 25, Heft 4, p. 158-161, 1919; *Münch. Med. Wochenschr.*, n° 29, 1924; n° 36, p. 1149-1151, 1923; n° 39, p. 1625-1626, 1925; *Gesundheits-Ingenieur*, tirage à part, 1926; *Zeitschr. f. d. Ges. Exp. Medizin*, Bd. 56, Heft 5/6, p. 543-561, 1927; *Zeitsch. f. Hyg.*, Bd. 112, Heft 3, p. 414-420, 1931..

Je signale en outre le travail important de :

PILOD (M.). et CODVELLE (F.). — *Ann. d'Hyg.*, Nouvelle série, n° 11, p. 654-694, 1932.

(1) Il est évident que dans la plasmoptyse de FISCHER la mort est immédiate.

(2) Dans tous les phénomènes de ce genre, il y a des différences de résistance individuelle considérables.

CHAPITRE V

ACTION DE *B. CARYOCYANEUS* SUR DIFFÉRENTS ORGANISMES VIVANTS

Je ne suis pas « *un médecin qui a approfondi l'étude des maladies parasitaires (largo sensu) de l'homme* ». (M. NICOLLE et J. MAGROU, 1922) et je ne connais guère les « *affections animales de même nature* », je suis seulement quelque peu familiarisée avec les maladies des plantes et j'ai quelque pratique de l'inoculation aux animaux. Je n'ai donc pas la prétention d'écrire un chapitre de pathologie comparée. Je veux simplement retracer l'histoire aussi complète que possible d'une Bactérie chromogène. Pour cela je dois non seulement décrire la réaction de cette Bactérie sous l'influence de différents facteurs, mais encore étudier l'action du germe sur divers organismes vivants. Ce qui me conduit à rechercher brièvement si *B. caryocyaneus* est pourvu de pouvoir pathogène et s'il peut déterminer chez un animal ou une plante convenablement choisis, des modifications humorales, c'est-à-dire l'apparition d'anticorps spécifique. Nous allons successivement étudier ces deux points en commençant par le pouvoir pathogène.

I. — Pouvoir pathogène

Si je faisais une étude détaillée du pouvoir pathogène, je devrais considérer successivement la virulence et le pouvoir toxigène; mais ainsi que je le disais plus haut, je ne veux pas faire œuvre de pathologiste, mais rechercher seulement les caractéristiques essentielles de *B. caryocyaneus*, je me bornerai donc à injecter des doses convenables de cultures d'âge et de provenance déterminés à des plantes et à des animaux.

Les essais ont été effectués avec des cultures d'âge variant de 1 à 10 jours. Ces cultures provenaient soit de bouillon, soit de gélose nutritive.

INJECTION A QUELQUES MAMMIFERES

B. caryocyaneus ayant été isolé du bois pourri d'un Saule et du moût d'une usine préparant des Levures industrielles, cette Bactérie doit probablement être dénuée de tout pouvoir pathogène pour les animaux à sang chaud. Ce n'est là qu'une première approximation, car dans des expériences mémorables (1898), M. le Professeur VINCENT a montré qu'il est possible

de faire acquérir à *B. mesentericus vulgatus* et à *B. megatherium* un pouvoir pathogène indéniable pour le Cobaye. Il suffit pour cela d'avoir recours à la méthode de ROUX, c'est-à-dire aux passages en sacs de collodion. De plus, parmi les Bactéries chromogènes bleues ou violettes et fluorescentes, nous savons qu'un certain nombre sont pathogènes pour les animaux à sang chaud, tels sont *B. pyocyaneus*, *B. smaragdinus fætidus*, *B. fluorescens liquefaciens*, *B. fluorescens putridus*, *B. chlororaphis* (LASSEUR), le Bacille vert de LESAGE, le Bacille violet de GAUDUCHEAU. En outre différents auteurs ont constaté la présence de Bacilles fluorescents dans les cavités naturelles de l'homme et des animaux. Certaines Bactéries fluorescentes déterminent aussi des troubles morbides chez les animaux à sang froid, tel est l'exemple de *B. chlororaphis*.

Les belles recherches de VINCENT, d'une part, le fait qu'un grand nombre de Bactéries fluorescentes sont capables de produire des troubles chez les animaux à sang chaud, d'autre part, m'ont conduite à tenter l'infection expérimentale chez les animaux habituellement utilisés dans les Laboratoires de bactériologie.

Le tableau ci-dessus schématise les résultats obtenus dans ces essais :

TABLEAU XXX

Inoculation de B. caryocyaneus aux animaux à sang chaud.

ANIMAL INOCULÉ	NOMBRE D'ANIMAUX en expé- rience	MODE D'INOCULATION	QUANTITÉ de culture injectée	RÉSULTATS DE L'INOCULATION
Lapin âgé de 5 à 6 semaines.	4	intraveineuse	1 cm ³	aucun trouble apparent (1)
Lapin âgé de 5 à 6 mois....	6	intrapéritonéale	7 cm ³	aucun trouble apparent
Lapin âgé de 10 à 12 mois...	6	intrapéritonéale	10 cm ³	aucun trouble apparent
Cobaye, poids variant de 200 grammes à 800 grammes.....	5	intrapéritonéale	0 cm ³ 5 à 7 cm ³	aucun trouble apparent
Souris blan- che.....	6	intrapéritonéale	0 cm ³ 1 à 0 cm ³ 2	aucun trouble apparent

(1) Les animaux en expérience n'offrent ni réaction locale, ni réaction générale perceptibles, il n'y a pas d'hyperthermie et les animaux continuent à augmenter de poids.

L'examen du tableau ci-dessus montre que l'injection intrapéritonéale ou intraveineuse ne détermine aucun trouble appréciable (1) chez les animaux inoculés. Il devient superflu de parler de virulence ou de pouvoir toxigène. Il est de toute évidence que le filtrat d'une culture ne peut pas se montrer doué d'un pouvoir pathogène supérieur à celui de la culture entière, tout au plus peut-il lui être égal. Il est vrai, cependant, que l'injection de hautes doses de filtrats aurait vraisemblablement déterminé des troubles chez l'animal expérimenté; mais ces troubles ne seraient pas dus à la sécrétion, par *B. caryocyaneus*, d'un produit spécifique hautement toxique : une toxine. Ces troubles seraient imputables à l'accumulation de déchets de la vie microbienne dans le liquide de culture. On sait, en effet, que lorsque les « *produits microbiens* » (au sens d'E. DUCLAUX, p. 192), atteignent une certaine concentration, ils deviennent toxiques et pour les plastides et pour les êtres plus élevés en organisation. L'indol, l'hydrogène sulfuré, les amines, les acides organiques, etc... ne peuvent être injectés à fortes doses sans déterminer des phénomènes d'intoxication; mais c'est là un fait banal qui s'observerait avec n'importe quelle vieille culture d'une Bactérie douée d'un pouvoir ferment un peu actif. C'est pour ces raisons que nous avons évité l'injection de trop hautes doses.

INOCULATION A LA GRENOUILLE

(*Rana temporaria* L.)

Dix-huit Grenouilles ont été réparties en trois lots, A, B, C. Le lot A, formé de 4 Grenouilles (2) servit de témoin. Le lot B était constitué par 7 Grenouilles qui reçurent chacune en injections intracavitaires 0 cm³ 5 d'une culture de 48 heures. Dans le lot C, les 7 Grenouilles en expérience reçurent 1 cm³ de la même culture dans le sac lymphatique dorsal.

Dans trois séries d'expérience, *B. caryocyaneus* s'est montré dénué de tout pouvoir pathogène pour *Rana temporaria* L.

(1) *B. caryocyaneus* se comporterait donc comme *B. caeruleus* Smith qui serait dépourvu de tout pouvoir pathogène (MIGULA) et comme *B. caeruleus* VOGES et *B. indigoferus* VOGES qui ne seraient pas pathogènes pour la Souris.

(2) Cette précaution est indispensable lorsqu'on opère dans des villes qui stérilisent l'eau par des doses massives de chlore.

INOCULATION AUX LARVES DE *GALLERIA MELLONELLA* GÉNÉRALITÉS

Dans ce paragraphe, je résumerai les essais que j'ai effectués sur les larves de *Galleria mellonella*. Bien que de date assez récente, l'histoire des Bactéries pathogènes des Insectes est déjà singulièrement compliquée. Il m'est impossible de citer tous les travaux ayant trait à cette question. Je rappellerai seulement les recherches de d'HERELLE (1911), PICARD et BLANC (1913), CHATTON (1914), PAILLOT (1913-1920), HOLLANDE et VERNIER (1920), METALNIKOV (1926-1927), HUBAULT (1928)).

Les Bactéries pathogènes des Insectes appartiennent en général au groupe des Coccobacilles mobiles. Or, *B. caryocyaneus* ne peut pas être ramené au type des Coccobacilles, mais la Bactérie isolée par BEIJERINCK produit un pigment fluorescent et elle a ce caractère commun avec le germe décrit par HOLLANDE et VERNIER. De plus, *B. caryocyaneus* a été isolé d'un Saule pourri. En raison de ce caractère de culture et de cette origine, j'ai recherché si *B. caryocyaneus* était capable de déterminer la mort des Insectes, et en particulier celle des larves de *Galleria mellonella*. Il m'a été possible d'avoir ce matériel en quantité suffisante et d'être initiée à la technique des inoculations par M. le Professeur METALNIKOV. Tous les travailleurs du Laboratoire ont encore présente à la mémoire la magistrale Conférence du célèbre pastorien et tous se rappellent avec quelle bienveillante attention l'éminent conférencier a bien voulu nous accueillir. Enhardie par cette extrême affabilité, j'ai demandé à M. le Professeur METALNIKOV de bien vouloir inoculer avec *B. caryocyaneus* une série de larves de *Galleria mellonella*. M. METALNIKOV connaît tout particulièrement bien *Galleria mellonella*, puisque depuis de longues années ces larves constituent son matériel préféré d'expérimentation.

TECHNIQUE

L'inoculation est effectuée (1) à l'aide de pipettes PASTEUR coudées dont l'extrémité est effilée avec grand soin sur environ 10 cm. Le diamètre du tube effilé est tel qu'1/100 de cm³ occupe une portion du tube sensiblement égale à 10 mm. Le tube effilé est gradué. Les larves reçoivent 1/100 de cm³ de suspension de concentration décroissante en corps microbiens. Etant données les faibles quantités de suspension injectées, celle-ci

(1) Je remercie Mlle Maguitot de son aide amicale.

doit être très homogène, sinon on s'exposerait à injecter des quantités de corps microbiens très différentes d'une larve à l'autre.

Les Bactéries provenant d'une culture sur gélose peptone (pH = 7), âgée de 24 heures, sont lavées trois fois à l'eau physiologique. Après homogénéisation de la suspension concentrée ainsi obtenue, on réalise par dilution des suspensions de concentration décroissante: 4 C, 2 C, C, C/2, C/4...., la concentration C renfermant quatre milliards de germes au cm³.

Les larves adultes sont très faciles à saisir entre le pouce et l'index. Il faut prendre soin, lors de l'injection, de ne pas endommager l'intestin, le cœur et les nerfs, aussi l'inoculation de la Chenille s'effectue-t-elle sur le côté, et non sur le dos ou l'abdomen.

Les animaux inoculés sont distribués dans des séries de boîtes de Pétri étiquetées avec soin. L'examen s'étend sur plusieurs jours. Mais c'est surtout durant les premières heures qui suivent l'inoculation que l'examen doit être le plus attentif.

L'expérience de contrôle a consisté à injecter à d'autres larves de *Galleria mellonella* 1/100 de cm³ d'eau physiologique stérile.

Les principaux résultats obtenus sont consignés dans les lignes suivantes.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Les résultats observés 20 heures après l'inoculation de suspension de *B. caryocyaneus* de concentrations décroissantes peuvent se schématiser de la façon suivante :

Suspension de concentration 4 C : animaux morts, 100 %.

Suspension de concentration 2 C : animaux morts, 100 %.

Suspension de concentration C : animaux morts, 60 %.

Suspension de concentration C/2 : animaux morts, 20 %.

Il est à remarquer qu'après 24 heures, le pourcentage des animaux morts atteint 100 % lorsque l'inoculation a été réalisée avec des suspensions de concentration C et C/2. Avec la suspension de concentration C/4, ce pourcentage n'est atteint qu'après 36 heures.

Dans ces essais, le pouvoir pathogène de *B. caryocyaneus* pour *Galleria mellonella* est indéniable puisque les animaux témoins résistent tous, ou à quelques unités près, à l'inoculation d'eau physiologique.

Les inoculations effectuées avec des suspensions bactériennes chauffées à 56° C durant trente minutes, n'ont déterminé chez les larves aucun trouble apparent. Les animaux continuent à se développer ou à tisser leur cocon.

INOCULATION A CERTAINS VEGETAUX

L'étude des Bactéries pathogènes des plantes est relativement récente. elle commence avec les travaux de BURRIL (1877), elle se continue par les investigations de PRILLIEUX (1879) WAKKER (1883-1889), SAVASTANO (1887) et NOACK (1893), (sur *Bacillus oleae*) et surtout par les admirables recherches de P. VUILLEMIN (1887-1888-1889-1894-1895...), et les expériences remarquables d'E. SMITH (1904-1905-1911-1913-1920). Depuis cette époque héroïque, J. MAGROU (1913-1918-1923-1924-1927), M. NICOLLE et J. MAGROU (1922), NOBÉCOURT (1927), BEAUVERIE (1) (1929), CARBONE et ARNAUDI (1930), M. A. BEAUVERIE (1932) ont, à des époques différentes, synthétisé l'état de nos connaissances sur les maladies bactériennes et l'immunité chez les végétaux.

En 1902, LÉPOUTRE est arrivé à faire acquérir une certaine virulence à *B. fluorescens liquefaciens*, *B. mycoides*, *B. mesentericus vulgatus* à l'égard des tissus végétaux. De plus, certaines Bactéries fluorescentes, *Bact. maculicolum*, *Bact. lachrymans*, sont les agents des affections maculeuses des plantes (M. NICOLLE et J. MAGROU, 1922).

En ce qui concerne les végétaux, l'origine de *B. caryocyaneus* ne pouvait pas être invoquée pour poser à priori que ce germe était dénué de pouvoir pathogène pour les plantes.

J'ai donc saisi avec empressement l'offre que me fit M. DOMBRAY, préparateur de M. le Professeur VUILLEMIN, de m'aider dans l'inoculation de *B. caryocyaneus* aux végétaux. Par ses recherches préalables sur l'injection des Hépatiques et surtout par les hautes connaissances qu'il avait acquises près du Maître qui illustra l'Université de Nancy par ses travaux de pathologie végétale, M. DOMBRAY devenait pour moi un guide sûr et expérimenté.

Le choix des plantes à étudier nous a été imposé par la nature des végétaux (*Begonia*) ou par l'emploi antérieur de ces végétaux dans des essais analogues (*Geranium*, *Pelargonium*, *Opuntia*).

Dans ces recherches, nous nous sommes conformés aux indications formulées par les auteurs spécialisés dans cette question, tels que CARBONE, ARNAUDI, NOBÉCOURT, MAGROU.

(1) Tout le monde connaît les beaux travaux de BEAUVERIE sur l'immunisation des végétaux contre la Toile (1899), les maladies cryptogamiques (1901) et ses recherches sur la résistance plastidaire (1921), etc..

Le tableau ci-dessous indique les résultats de l'inoculation de *B. caryocyaneus* à différentes plantes :

TABLEAU XXXI

Inoculation de B. caryocyaneus aux végétaux.

PLANTE INOCULÉE	SIÈGE D'INOCULATION	OBSERVATIONS	RÉSULTAT DE L'INOCULATION
<i>Begonia</i>	1) tige 2) feuille	La culture injectée s'irradie dans le mésophylle.	Aucune action apparente. Les plaies faites par la fine aiguille se cicatrisent rapidement. La plante fleurit.
<i>Geranium</i> <i>Pelargonium</i>	1) tige 2) feuille	(L'inoculation dans la tige est difficile parce que la tige est trop ligneuse. La culture injectée s'irradie dans le mésophylle.	(Aucune action apparente. Les plantes continuent à se développer.
<i>Opuntia</i>	Cladode : inoculation 1) superficielle 2) profonde		(Aucune action apparente. La plante se développe et donne de nouveaux cladodes.

Dans nos conditions d'expérience, *B. caryocyaneus* s'est montré dépourvu de virulence pour *Begonia*, *Geranium*, *Pelargonium* et *Opuntia*. Avec d'autres plantes, les résultats auraient pu être différents, mais je cherchais à préciser dans leurs grandes lignes les caractéristiques de *B. caryocyaneus* et rien de plus.

BIBLIOGRAPHIE

- BEAUVÉRIE (M.-A.). — *Ann. du Service de Botanique et Agronomie de Tunisie*, T. IX, 175 pages, 1932.
- CHARRIN (A.). — *C. R. Acad. Sc.*, T. 116, 1893; *C. R. Soc. biol.*, 1893; *Revue de Viticulture*, 1895.
- VON EULER (H.). — *Deuxième Congrès intern. de Path. comparée*, 3 pages, 1932.
- HOLLANDE (A.-Ch.) et VERNIER (P.). — *C. R. Acad. Sc.*, T. 171, p. 206-208, 1920.

- HUBAULT (E.). — *C. R. Acad. Sc.*, T. 186, p. 1157, 1928.
- LASSEUR (Ph.). — *Thèse doctorat Sciences*, Nancy, p. 123-136, 1911.
- LAURENT (E.). — *Ann. Inst. Past.*, 1899.
- LEPOUTRE (E.). — *Ann. Inst. Past.*, T. 16, p. 304, 1902.
- MAGROU (J.). — *Rôle des microbes dans la vie végétale, maladie et symbiose, Biologica*, 1913. — *Revue Path. végét. et Entom. Agric.*, T. x, fasc. 1, p. 41, 1923. — *Ann. Inst. Past.*, T. xli, n° 7, p. 785-861, 1927.
- MAZÉ (P.) et MAZÉ FILS (J.-P.). — *C. R. Soc. biol.*, T. cix, p. 518, p. 1087, 1932.
- METALNIKOV (S.). — *Ann. Inst. Past.*, vol. xl, p. 787, 1926. *L'infection et l'immunité chez la mite des abeilles Galleria mellonella*, Paris, Masson, 1927.
- NICOLLE (M.) et MAGROU (J.). — *Les maladies parasitaires des plantes*, Paris, Masson, 1922.
- NOACK. — *Zeitschr. f. Pflanzenkrankh.*, T. III, 1893.
- PRÉVOST (B.). — *Ann. Sc. Nat. Bot.*, 4^e série, T. II, 1807.
- PRILLIEUX. — *Bull. Soc. bot.*, p. 31, 1879.
- SAVASTANO. — *Ann. della r. Scuola sup. d'Agric. in Portici*, vol. V, 1887.
- SMITH (E.). — *U. S. départ. of agriculture*, T. XVII, 1904; *Carnegie Inst. Washington D. C.*, vol. II, p. 93, 1911.
- VINCENT (H.). — *Ann. Inst. Past.*, T. 12, p. 785, 1898.
- VUILLEMIN (P.). — *Traité de pathologie générale*, T. I, p. 125-152, 1895; *Nouveau Traité de pathol. générale*, T. I, p. 180-218, 1910; *Revue scientifique*, 61^e année, n° 3, p. 65-71, 1923.
- WAGNER. — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. II, Bd. 42, p. 613, 1915.

II. — Réactions anticorps

Nous venons d'étudier la réaction macroscopique de divers organismes vivants à l'injection de *B. caryocyaneus* et nous avons vu que *B. caryocyaneus* ne semble pas déterminer de modifications sensibles chez les différents organismes expérimentés. Ce n'est là qu'une première approximation, *B. caryocyaneus* pourrait y occasionner des modifications décelables seulement par l'emploi de l'antigène homologue, ce qui nous conduit à la recherche des agglutinines, et des sensibilisatrices spécifiques chez les animaux et les plantes injectés.

Les réactions d'agglutination permettent de définir l'anticorps quand on connaît l'antigène ou d'identifier l'antigène lorsque l'anticorps est défini. J'envisagerai donc successivement le pouvoir antigène et le pouvoir fixateur de *B. caryocyaneus* chez les animaux et chez les végétaux, puis j'essaierai, à l'aide des réactions anticorps, d'établir des « parentés humorales » (G. BOHN et A. DRZEWINA) entre les différents germes, affinités que ne laisse pas toujours prévoir l'étude morphologique et physiologique.

POUVOIR ANTIGENE

GÉNÉRALITÉS

On a pensé, pendant très longtemps, qu'une substance ne pouvait jouer le rôle d'antigène qu'à la condition de posséder une certaine toxicité vis-à-vis de l'organisme expérimenté. Or, il est apparu bien vite que la distinction entre Bactérie pathogène et Bactérie saprophyte n'était pas aussi facile à faire qu'on l'avait primitivement supposé; en effet, dans des recherches célèbres, VINCENT a montré que des germes généralement dépourvus de tout pouvoir pathogène peuvent, dans certaines conditions d'expérience, causer des troubles plus ou moins graves dans l'organisme où ils sont introduits. De plus, on s'est aperçu qu'un grand nombre de substances non toxiques peuvent déterminer, dans un organisme sensible, la formation d'anticorps spécifiques, et les expériences classiques de VINCENT sur les cryptotoxines (1907-08-09-26-27-28-30-31-32) montrent qu'il est possible de supprimer la toxicité d'une toxine tout en lui conservant ses propriétés antigènes (1). VINCENT a en effet démontré dans de nombreuses publications « *que certains corps colloïdaux ou non colloïdaux sont capables de se fixer sur les toxines microbiennes et de les transformer en cryptotoxines inoffensives et immunigènes* ». (2) (VINCENT, 1932). On connaît aussi la neutralisation de la toxine diphtérique par le formol (anatoxine de RAMON).

On ne peut donc pas, à priori, limiter l'étude du pouvoir antigène aux Bactéries pathogènes, d'ailleurs un grand nombre de recherches et en particulier celles de LASSEUR et de ses Collaborateurs (1924-1928) ont montré que des germes pratiquement dépourvus de virulence ou de pouvoir toxigène peuvent néanmoins, par injections parentérales, déterminer chez l'animal sensible la formation d'agglutinine et de sensibilisatrice homologues. Tel est le cas, par exemple, de *B. Le Monnier*, qui, en raison de sa tempé-

(1) Vraisemblablement l'antigène synthétique préparé par AVERY et GOEBEL (1931) ne possède pas de propriétés toxiques bien accusées. C'est un point sur lequel il est bien difficile de se prononcer, puisque les auteurs ont omis de le signaler dans leurs admirables recherches sur les antigènes pneumococciques.

(2) Parmi ces substances neutralisantes, il faut citer les sels de soude de « *certaines acides de la série benzénique (salicylique, benzoïque), ou biacides de cette série, certains acides à fonctions mixtes, enfin quelques corps s'éloignant de ces derniers (phényldiméthylpyrazolone, phényldiméthylméthylaminopyrazolone)*. L'action neutralisante pour s'exercer sur les toxines tétanique, diphtérique, colibacillaire, paratyphiques A et B, les toxines du *Vibron septique* du *Bacille de Shiga*, du *B. œdematiens*, etc. »

rature maximum de culture ne saurait produire de trouble chez les animaux à sang chaud.

Il paraît difficile aujourd'hui de parler d'antigène sans définir ce que l'on entend par *haptène* au sens de LANDSTEINER. Ce savant a préparé des complexes antigènes dont les groupes chimiques spécifiques se composent de substances bien définies reliées à une molécule protéique. Or, chose curieuse, les complexes antigènes peuvent contenir des substances spécifiquement actives *in vitro* non antigéniques par elles-mêmes. A ces substances, LANDSTEINER a donné le nom d'*haptènes*. On trouve des haptènes dans les polysaccharides isolés par les auteurs américains (1) des plastides de Pneumocoque et de la gomme arabique.

J'étais donc autorisée à étudier les modifications humorales produites par injections répétées de suspensions de *B. caryocyaneus*. Je dirai tout d'abord que ces essais ont été largement couronnés de succès puisqu'il m'a été permis d'obtenir des sérums agglutinants dont la dilution limite d'agglutination dépasse le 1/100.000 (et cela au bout de 4 heures à 37° C seulement). Si l'on veut bien se rappeler l'exemple classique du sérum du Cheval « Zoroastre » titrant 45.000 unités d'agglutinine typhique (2), nous voyons que *B. caryocyaneus* est doué d'un pouvoir antigène comparable à celui du Bacille typhique.

Avant d'envisager les résultats obtenus dans ces essais, nous allons préciser quelques points de technique relatifs à l'obtention des suspensions bactériennes et à la préparation des animaux.

TECHNIQUE

PRÉPARATION DES SUSPENSIONS

Les suspensions sont réalisées à l'aide de corps microbiens lavés 3 fois à l'eau physiologique. A cet effet, des cultures âgées de 48 heures effectuées sur gélose peptone (pH = 7) répartie en boîtes de ROUX sont recouvertes d'une quantité convenable d'eau physiologique. Les corps microbiens sont mis en suspension par un mouvement de balancement. La suspension ainsi obtenue est filtrée sur soie pour retenir les fragments de gélose qui auraient pu être entraînés. On procède au lavage à l'aide d'une centrifugeuse à grande vitesse (nombre de tours : 12.000 ; rayon moyen : 85 mm.). Après 3 lavages la suspension est homogénéisée par agitation avec des bil-

(1) HEIDELBERGER, AVERY, KENDALL, GOEBEL, TILLET, MORGAN, SIA, NEILL.

(2) Expérience d'EISENBERG et VOLK (1902).

les de verre puis soumise à une légère centrifugation pour éliminer les gros amas qui ont pu persister. Par dilution on amène la suspension à la concentration de 4 milliards de germes au cm³.

PRÉPARATION DES ANIMAUX.

Choix du matériel bactérien utilisé.

Nous avons vu que *B. caryocyaneus* peut :

1° perdre la faculté de sécréter son pigment bleu tout en conservant la propriété de fabriquer du pigment fluorescent vert (race F).

2° devenir complètement achromogène (race achromogène).

Il était donc intéressant de rechercher si la diminution ou la perte de la chromogénèse s'accompagnait d'un fléchissement parallèle du pouvoir antigène, c'est la raison pour laquelle j'ai préparé des animaux non seulement avec *B. caryocyaneus* type normal, mais encore avec *B. caryocyaneus* type F et avec la race achromogène.

Les essais effectués dans cette voie avaient tout d'abord pour but l'étude du pouvoir antigène de *B. caryocyaneus*. Mais je fus bientôt conduite à approfondir certains points du mécanisme des réactions anticorps; c'est pourquoi j'ai tenté la production d'agglutinines multiples, c'est-à-dire la préparation d'un même animal avec plusieurs espèces bactériennes.

Avec certains animaux, j'ai utilisé les 3 germes fluorescents suivants: *B. caryocyaneus* + *B. chlororaphis* + *B. pyocyaneus pyocyanogenes*.

Pour d'autres animaux, j'ai employé en collaboration avec Mlle R. LÉCAILLE un antigène manifestement très éloigné des Bactéries fluorescentes, c'est ce qui est réalisé dans la combinaison suivante: *B. caryocyaneus* + *B. pyocyanogenes* + *Torula colliculosa*.

Nombre d'injections — Mode d'injection.

Les 20 Lapins préparés ont reçu de 11 à 16 injections de corps microbiens, espacées d'une semaine, les injections à doses croissantes ont été faites tout d'abord par voie sous-cutanée, puis par voie intrapéritonéale. Les 6 premières injections ont été effectuées avec des germes tués par la chaleur. Pour déterminer la mort des plastides bactériennes, les suspensions ont été chauffées 40 minutes à 50° C. La grande sensibilité de *B. caryocyaneus* à l'élévation de température permet d'obtenir la mort sans avoir recours aux températures élevées. Les 5 ou 10 dernières injections ont été pratiquées avec des germes vivants. Les quantités de corps micro-

biens injectés ont varié de 0 cm³ 5 à 20 cm³. Les animaux ont été saignés huit jours après la dernière injection. Le sérum obtenu a conservé ses propriétés pendant plusieurs années.

Marche de la préparation des animaux.

Dans la préparation des animaux par les Bactéries chromogènes, LASSEUR est arrivé aux conclusions suivantes :

1° avec les germes pathogènes tels que *B. chlororaphis*, *B. pyocyaneus*, les animaux en voie de croissance continuent à augmenter de poids durant la préparation qui s'étend sur un laps de temps de 3 à 4 mois. Les animaux adultes offrent d'abord un fléchissement du poids durant les premières injections, mais très rapidement les animaux reviennent au poids primitif et comme on leur distribue une ration riche, tous présentent une augmentation de poids très sensible à la fin de la préparation.

2° avec les germes dépourvus de pouvoir pathogène, *B. Le Monnier* par exemple, on a souvent des pertes d'animaux au cours de l'immunisation et de plus, une diminution considérable du poids des animaux.

Ces résultats avaient conduit LASSEUR à dire que la préparation des animaux est plus facile avec les germes doués d'un léger pouvoir pathogène qu'avec les germes dépourvus de toxicité.

Or, *B. caryocyaneus*, avons-nous vu, ne possède pas de virulence, ni de pouvoir toxique appréciable et cependant la préparation des animaux ne présente aucune difficulté. Les animaux accusent une augmentation de poids à la fin de la préparation. Ces faits montrent une fois de plus que la présence d'un pouvoir toxique n'est nullement indispensable à l'obtention de modifications humorales et que les corps microbiens atoxiques et avirulents ne conduisent pas fatalement à l'hypersensibilité (1).

RESULTATS EXPERIMENTAUX

L'introduction parentérale d'une substance protéique étrangère détermine dans l'organisme sensible des modifications humorales et l'apparition de propriétés agglutinantes, sensibilisantes, opsonisantes, antitoxiques. L'ab-

(1) A. ZIRONI (1931) a consacré un long rapport à l'hyperréceptivité. Le savant italien se demande si l'hyperréceptivité ne serait pas due à une perte du pouvoir bactéricide des humeurs imputable soit à la présence de substance empêchant « entravant la bactériolyse » soit au fait « que les antigènes et les anticorps ne se trouvent pas dans les rapports optimales pour la production du phénomène ». (*Bolletino della Sezione Italiana*, p. 139, avril 1931).

sence de pouvoir toxigène de *B. caryocyaneus* limite l'étude des réactions anticorps aux agglutinines et aux sensibilisatrices.

AGGLUTINATION

L'agglomération sérique des Bactéries a été découverte par CHARRIN et ROGER (1889) sur le Bacille pyocyanique, germe sécrétant un pigment fluorescent vert et des pigments bleu, rouge ou noir. Fait assez inattendu, *B. caryocyaneus* s'est révélé comme un antigène bien supérieur à *B. pyocyaneus*. C'est ce qui semble résulter de l'examen du tableau ci-dessous où j'indique les dilutions limites d'agglutination de quelques sérums.

TABLEAU XXXII

DÉSIGNATION des Lapins préparés	DÉSIGNATION DES BACTÉRIES ayant servi à la préparation de l'animal	DILUTION LIMITE D'AGGLUTINATION des sérums obtenus
A	<i>B. caryocyaneus</i> type normal...	1/100.000
B	<i>B. caryocyaneus</i> race F.....	1/100.000
C	<i>B. pyocyaneus pyocyanogenes</i> ..	1/4.000
D	<i>B. pyocyaneus erythrogenes</i> (souche LASSEUR).....	1/4.000

La valeur de ces dilutions limites d'agglutination est d'autant plus intéressante que les suspensions de *B. caryocyaneus* sont des suspensions très stables, ainsi qu'en témoignent les essais de précipitation par les ions H+ et notamment par HCl.

La suspension bactérienne additionnée de doses croissantes d'acide chlorhydrique reste homogène pour les systèmes dont la concentration finale en acide chlorhydrique varie de N/4 à N/128. Seuls sont précipités les systèmes correspondant à la concentration en HCl N/256.

La valeur élevée de la dilution limite d'agglutination sérique ne pouvant être attribuée à une instabilité (hyperagglutinabilité) des suspensions de *B. caryocyaneus*, nous allons étudier maintenant l'aspect de l'agglutination.

ASPECT DE L'AGGLUTINATION

L'agglutination sérique des Bactéries offre des aspects qui varient, en général, avec l'activité des sérums et pour un sérum donné avec son degré de dilution, c'est-à-dire avec sa richesse en agglutinines.

Certaines Bactéries s'agglomèrent très rapidement sous l'action de leur sérum homologue en donnant de gros amas compacts dans lesquels les plastides sont serrées les unes contre les autres au point qu'il est impossible de distinguer la forme d'un élément microbien (Bacille typhique, *B. prodigiosus*...). Pour d'autres germes, au contraire, les amas sont lâches, ils sont formés de plastides disposées sans ordre et constituant des mailles où la forme des plastides est toujours très perceptible, c'est ce que l'on observe avec *B. balticus*. On sait que pour certains sérums il est possible, par dilutions convenables, de passer de l'amas compact à l'amas lâche, mais avec d'autres germes tels que *B. balticus*, l'amas reste lâche pour toutes les concentrations du sérum utilisées.

B. caryocyaneus s'est comporté d'une façon analogue à celle de *B. balticus*. Quelles que soient la concentration du sérum considérée et la nature du système envisagé, je n'ai jamais observé d'amas compacts.

Considérons une série de tubes : *a, b, c, d, e, f, g,...* dans lesquels on dépose 1 cm³ de suspension bactérienne, puis à chacun de ces tubes on ajoute 1 cm³ d'une dilution croissante de sérum homologue. Dans le tube *a* qui représente le système le plus riche en agglutinine, on remarque un dépôt microbien blanc surmonté d'un liquide clair, tandis que le tube *f*, peu riche en agglutinine, montre un très léger dépôt surmonté d'un liquide louche, enfin les tubes *h, i, j, k*, de plus en plus pauvres en agglutinine, présentent des systèmes homogènes.

Examinons maintenant au microscope tous les systèmes agglutinants. Pour la zone des fortes concentrations (tubes *a, b, c, d,*), on n'observe que de gros amas avec peu ou pas de plastides isolées. Le tube *f* montre des amas petits ou moyens ainsi que beaucoup de plastides isolées. Le tube *h* qui paraît homogène à l'œil et à la loupe présente au microscope un grand nombre de très petits amas, mais dans ce tube, les plastides isolées sont en plus grand nombre que dans le tube *f*. Enfin l'examen microscopique du tube *k* ne décèle que des plastides isolées.

Il résulte de ces essais que l'agglutination peut avoir lieu, bien qu'elle ne soit pas perceptible ni à l'œil, ni à la loupe. Il y a donc là une question d'échelle d'observation et toute dilution limite d'agglutination doit être définie en mentionnant l'échelle d'observation. D'ailleurs en opérant ainsi on précise le sens des mots utilisés dans la nomenclature sérologique.

Le tableau ci-dessous schématise les différents aspects des systèmes agglutinants en fonction du temps et de l'échelle d'observation.

TABLEAU XXXIII

Aspect de l'agglutination sérique de *B. caryocyaneus*

par le sérum homologue.

Phénomène de CHARRIN et ROGER.

STADES	ASPECT DU SYSTÈME OBSERVÉ		
	au microscope	à la loupe	à l'œil nu
1 ^{er} stade Temps mort.....	Homogène; plastides isolées	Homogène	Homogène
2 ^e stade.....	Quelques petits amas; nombreuses formes isolées; début d' <i>agglutination</i>	Homogène	Homogène
3 ^e stade.....	Amas moyens Quelques formes isolées; <i>Agglutination</i>	Très fins flocons; début de <i>floculation</i>	Homogène
4 ^e stade.....	Gros amas et amas moyens <i>Agglutination</i>	Gros flocons; <i>floculation</i>	Fin précipité début de <i>précipitation</i>
5 ^e stade.....			Dépôt; liquide louche <i>précipitation</i>
6 ^e stade.....			Dépôt; liquide clair; <i>précipitation</i>

Les systèmes agglutinants peuvent être examinés à un autre point de vue; en effet, on constate la présence, souvent en nombre considérable, de plastides isolées à côté d'amas moyens et petits cependant assez nombreux.

Pour expliquer ces faits, deux hypothèses peuvent être émises :

1^{re} *hypothèse*. — La suspension est formée de deux types de Bactéries, les unes sensibles, les autres insensibles à l'action du sérum homologue.

Cette notion de biotypes ne peut être considérée jusqu'à présent que comme une vue de l'esprit, et si elle est conforme aux idées régnantes sur la variation, il lui manque malheureusement la sanction expérimentale. Remarquons en passant que cette théorie intrigue singulièrement LASSEUR, qui,

on le sait, a adopté la théorie des biotypes au sens de l'illustre biologiste L. CUÉNOT. Aussi au Laboratoire tente-t-on actuellement de vérifier l'existence de biotypes sérologiques.

2^e hypothèse. — La fixation de l'agglutinine sur l'antigène est une réaction limitée réversible.

Dans la conception de l'adsorption, la réaction est considérée comme limitée quant à l'anticorps, mais elle ne l'est pas obligatoirement en ce qui concerne l'antigène, cependant rien ne s'opposerait à ce qu'il en soit ainsi. D'autre part, on sait que la fixation de l'anticorps sur l'antigène s'explique aussi en faisant intervenir la notion d'affinité qui permet l'orientation de la molécule anticorps. L'abîme qui séparait la théorie de MADSEN et ARRHENIUS de la théorie de l'adsorption de l'anticorps se comble peu à peu par l'accumulation des faits découverts journellement.

Et actuellement il est impossible de décider entre ces deux hypothèses.

BIBLIOGRAPHIE

- ARRHENIUS (S.) et MADSEN (Th.). — *Contribution from Univ. Laborat. f. med. bacteriol. to celebrate the inaug. of State Seruminst.*, édit. C. J. Salomonsen, Copenhague, III (87 pages), IV (7 pages), 1902; *Bull. Acad. roy. Sc. et Lettres*, Danemark, n° 4, p. 269-305, 1904.
- AVERY (O.-T.) et MORGAN (H.-J.). — *Journ. of experim. Med.*, vol. 42, n° 2, p. 347-354, 1925.
- AVERY (O.-T.) et NEILL (J.-M.). — *Journ. of experim. Med.*, vol. 42, n° 2, p. 355-366, 1925.
- AVERY (O.-T.) et HEIDELBERGER (M.). — *Journ. of experim. Med.*, vol. 42, n° 2, p. 367, 1925.
- AVERY (O.-T.) et GOEBEL (W.-F.). — *Journ. of experim. Med.*, vol. 50, n° 4, p. 533-550, 1929; vol. 54, n° 3, p. 437-447, 1931.
- DUPAIX (A.), SARKIS (G.) et MAGUITOT (C.). — *Bull. Assoc. des Diplômés de Microbiol.*, Faculté Pharmacie Nancy, n° 3, p. 7-16, 1932.
- DUPAIX (A.). — *Bull. Assoc. des Diplômés de Microbiol.*, Faculté Pharmacie Nancy, n° 3, p. 17-25, 1932.
- GOEBEL (W.-F.) et AVERY (O.-T.). — *Journ. of experim. Med.*, vol. 50, n° 4, p. 521-531, 1929; vol. 54, n° 3, p. 431-436, 1931.
- HEIDELBERGER (M.), GOEBEL (W.-F.) et AVERY (O.-T.). — *Journ. of experim. Med.*, vol. 42, n° 2, p. 701, 1925; p. 709, 1925; p. 727, 1925.
- HEIDELBERGER (M.), AVERY (O.-T.) et GOEBEL (W.-F.). — *Journ. of experim. Med.*, vol. 49, n° 5, p. 847-857, 1929.

- HEIDELBERGER (M.). et KENDALL (F.-E.). — *Journ. of Biolog. Chemist.*, vol 84, n° 2, p. 639-653, 1929; *Journ. of experim. Med.*, vol. 50, n° 6, p. 809-823, 1929; *Science*, vol. 71, n° 1846, p. 511-512, 1930; *Science*, vol. 72, n° 1862, p. 252-253, 1930; *Journ. of experim. Med.*, vol. 53, n° 5, p. 625-639, 1931.
- HEIDELBERGER (M.), SIA (R.-H.-P.) et KENDALL (F.-E.). — *Journ. of experim. Med.*, vol. 52, n° 4, p. 477-483, 1930.
- LANDSTEINER et REICH. — *Centralbl. f. Bakt.*, Bd. 39, p. 83, 1905.
- LASSEUR (Ph.) et SPILLMANN (L.). — *Réactions Anticorps*, fasc. I, 215 pages, 1921.
- LASSEUR (Ph.). — *Bull. Assoc. Diplômés Microbiol.*, Faculté Pharmacie Nancy, n° 3, p. 3-6, 1932; n° 4, p. 3-8, 1932.
- LECOMTE DU NOUY (P.). — *Correspondant* du 25 septembre 1931 (13 pages).
- MADSEN (Th.). — *Contribution from Univ. Laborat. for med. bacteriol. to celebrate the inaug. of State Seruminst.*, VIII; 13 pages, 1902.
- MADSEN (Th.) et STRENG (O.). — *Saertryk af Medd. f. Stat. Seruminst.*, Bd. IX, p. 23-26, 1917.
- MADSEN (Th.) et WALBUM (L.). — *Saertryk af Medd. f. Stat. Seruminst.*, Bd. IX, p. 1-8, 1917; p. 9-21, 1917.
- TILLET (W.-S.), AVERY (O.-T.) et GOEBEL (W.-F.). — *Journ. of experim. Med.*, vol. 50, n° 5, p. 551-567, 1929.
- VINCENT (H.). — *C. R. Soc. biol.*, T. 63, p. 623, 695, 1907; T. 64, p. 162, 729, 1908; T. 67, p. 679, 1909; T. 95, p. 1525, 1926; T. 108, p. 756, 1931; T. 109, p. 15, 1932; *Ann. Inst. Past.*, T. 22, p. 341, 1928; *Bull. Acad. med.*, T. 28, 1928; *C. R. Acad. Sc.*, T. 186, p. 1175, 1928; T. 191, p. 463, 1930; T. 193, p. 620, 798, 1931.
- VINCENT (H.) et VELLUZ (L.). — *C. R. Acad. Sc.*, T. 192, p. 648, 1931; T. 193, p. 969, 1931.

MODIFICATIONS

DE L'AGGLUTINABILITE DE *B. caryocyaneus*

Dans des observations anciennes, ACHARD et BENSAUDE ont constaté que l'agglutinabilité des Bactéries variait d'une souche bactérienne à l'autre. Ultérieurement, une série de recherches ont montré qu'il était possible de faire varier l'agglutinabilité des Bactéries en ayant recours à un certain nombre d'artifices. Citons à ce sujet les recherches de NICOLLE et TRENEL (1902), KIRCHSTEIN (1904), SHIBAMAYA (1905), TARCHETTI (1898), EISENBERG et VOLK (1902), PORGES (1905), ALMAGIA (1906), LAUBENHEIMER (1909), etc...

Ne pouvant pas envisager tous les facteurs qui modifient l'agglutinabilité des Bactéries, je me limiterai à rechercher l'influence :

- 1) du chauffage à 80° C.;

- 2) de la concentration des systèmes agglutinants en corps microbiens ;
- 3) de la réaction des milieux de culture utilisés pour la production des corps microbiens servant à l'agglutination ;
- 4) de la présence dans le milieu de culture de certaines substances telles que l'acide phénique et le chlorure de lithium.

INFLUENCE DU CHAUFFAGE A 80° C.

Puisque de nombreux germes perdent partiellement ou complètement leur agglutinabilité par chauffage à 80° C., il est intéressant de rechercher comment *B. caryocyaneus* réagit à l'élévation de température. Le tableau ci-dessous indique le comportement des suspensions de *B. caryocyaneus* chauffées et non chauffées en présence de sérum homologue.

TABLEAU XXXIV

DILUTION du sérum dans le système agglutinant	ASPECT DES SYSTÈMES réalisés avec les suspensions (1)	
	chauffées à 80° C.	non chauffées
1/2000 (2)	Homogène	Dépôt liquide clair
1/4000	Homogène	Dépôt liquide louche
.....		
1/80.000	Homogène	Très fin précipité (3)
Témoin	Homogène	Homogène

Le chauffage à 80° C. détermine donc une stabilité telle des suspensions de *B. caryocyaneus* qu'elles restent homogènes, même pour une dilution du sérum agglutinant égale au 1/100, tandis que les suspensions non chauffées présentent encore un très fin précipité perceptible à la loupe pour les dilutions de 1/80.000.

(1) Après 4 heures de séjour à 37° C.

(2) De la dilution 1/100 à la dilution 1/1000, on observe le même aspect qu'à la dilution 1/2000.

(3) A la loupe, le microscope décèle encore la présence d'amas assez gros et d'amas moyens à côté de formes isolées.

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DES SYSTÈMES AGGLUTINANTS EN CORPS MICROBIENS. NOTION D'OPTIMUM D'AGGLUTINATION.

L'influence de la concentration en germes du système agglutinant a préoccupé les bactériologistes dès la première heure. FÖRSTER (1897), LANDSTEINER (1897) ont montré que la dilution limite d'agglutination varie avec la concentration en corps microbiens, et SACQUÉPÉE, Ch. NICOLLE (1904) proposaient l'emploi de suspensions microbiennes de richesse connue.

LASSEUR et ses Collaborateurs (HUBLER, LAVILLE et P. VUILLEMIN junior) ont longuement insisté, en 1921, sur la marche des réactions anticorps en présence de quantités croissantes d'antigène, la quantité d'anticorps restant constante. De même, dans l'étude de l'agglutination du Bacille tuberculeux, SPHEL (1923) a signalé l'influence de la concentration des suspensions en corps microbiens. En 1929, DA COSTA CRUZ a attiré l'attention sur l'existence possible d'un optimum d'agglutination.

Nous avons recherché dans quelle mesure l'agglutination de *B. caryocyanus* montrait un optimum. Ce sont ces résultats que nous indiquons ci-dessous :

TABLEAU XXXV

CONCENTRATION EN CORPS MICROBIENS DE LA SUSPENSION de <i>B. caryocyanus</i>	DILUTION LIMITE D'AGGLUTINATION
2 C (1)	1/80.000
C	1/80.000
C/2	1/80.000
C/4	1/64.000 ?
C/8	1/64.000 ?

L'examen du tableau ci-dessus montre que lorsque la concentration de l'antigène varie dans le rapport de 1 à 16, la marche de l'agglutination n'est pas sensiblement modifiée. Pour les zones de faible concentration en corps microbiens, les examens microscopique et macroscopique sont très difficiles et par conséquent il est impossible d'affirmer que 1/64.000 soit bien la dilution limite d'agglutination des systèmes de concentration en corps microbiens C/4 et C/8. Ce fait n'a rien de surprenant, car ainsi que

(1) Par concentration C, il faut entendre une concentration de 4 milliards de germes au cm³.

le fait si justement remarquer LASSEUR, il faut distinguer deux stades dans les réactions anticorps. Le premier stade: la fixation de l'anticorps sur l'antigène est évidemment sous la dépendance de la concentration en anticorps et en antigène, le deuxième stade: la précipitation ne doit pas forcément présenter un optimum. Lorsqu'on s'adresse à des sérums très actifs, on opère de ce fait dans des systèmes peu riches en protéine (corps stabilisants), il y a beaucoup de chances pour que l'optimum de précipitation fasse défaut. C'est ce qui se réalise notamment avec *B. caryocyaneus*. Tout autre est le résultat, si on opère avec des sérums peu riches en agglutinine exigeant, de ce fait, l'emploi de fortes concentrations en sérum. C'est ce qui s'observe, en effet, dans les essais de LASSEUR et LÉCAILLE (1930) relatifs à l'agglutination sérique des *Champignons*.

INFLUENCE DE LA RÉACTION DU MILIEU DE CULTURE UTILISÉ POUR LA PRODUCTION DES CORPS BACTÉRIENS SERVANT A L'AGGLUTINATION.

On connaît le rôle de la charge (1) des plastides dans l'agglutination des Bactéries, et on conçoit que les éléments bactériens puissent adsorber des quantités variables d'ions H^+ ou d'ions OH^- suivant la réaction du milieu de culture employé; si ce fait était exact, il serait possible de faire varier l'agglutinabilité des Bactéries en utilisant des milieux de culture de pH différents.

Afin de vérifier le bien fondé de cette hypothèse, j'ai cultivé *B. caryocyaneus* sur des géloses nutritives de pH = 5,5, pH = 7 et pH = 8 (2).

Le tableau ci-dessous schématise les résultats obtenus dans ces expériences.

TABLEAU XXXVI

DÉSIGNATION des systèmes	pH DES MILIEUX DE CULTURE utilisés pour la production des corps microbiens servant à l'agglutination	DILUTION LIMITE d'agglutination
A	5,5	1/100.000
B	7	1/100.000
C	8	1/100.000

(1) « Observations sur le mécanisme de l'agglutination sérique des microbes. (Phénomène de CHARRIN et ROGER). » *Archiv. f. Mikrobiologie*, Bd I, Heft I, p. 137-164, 1930, par Ph. LASSEUR et A. DUPAIX.

(2) Il ne faut pas oublier que, quelle que soit leur origine, les germes microbiens destinés à l'agglutination sont soumis à trois lavages à l'eau physiologique.

L'agglutination effectuée avec les germes cultivés sur ces différents substrats nutritifs conduit à la conclusion suivante : dans la limite où la réaction du milieu permet la végétation normale de *B. caryocyanus*, des variations de pH des milieux de culture (1), n'influencent pas sensiblement la marche de l'agglutination sérique des plastides.

LA CULTURE EN MILIEU PHÉNIQUÉ PEUT-ELLE MODIFIER L'AGGLUTINABILITÉ DES BACTÉRIES ?

La stabilité des suspensions diminue lorsque la différence de potentiel (D. P.) (2) décroît, on peut espérer réaliser une chute de la D. P. par culture des germes sur milieu renfermant des quantités convenables d'ions H⁺. Or, nous venons de voir que lorsque le pH varie de 5,5 à 8, les dilutions limites d'agglutination sont du même ordre, ce fait n'implique pas qu'il en soit de même pour une variation beaucoup plus grande du pH. D'ailleurs FABRY (1921) a constaté que le Bacille de SHIGA et le Bacille typhique deviennent de plus en plus agglutinables lorsqu'ils sont cultivés un certain temps en milieu phéniqué. Il est à remarquer qu'en dehors d'une modification de la différence de potentiel, la culture en milieu phéniqué pourrait faire varier l'agglutinabilité des Bactéries par des variations de la forme des plastides. Tout le monde sait par exemple que le Colibacille présente un raccourcissement des plastides lorsqu'il est cultivé en présence d'acide phénique. Or, BILLITZER a montré qu'il existe une certaine relation entre l'agglutinabilité des germes et leur grosseur relative. Il ne faut pas exagérer l'importance de cette observation, car l'éminent Professeur de physique de Dijon, M. BOUTARIC, considère que « *la stabilité d'une solution colloïdale vis-à-vis d'un électrolyte donné dépend beaucoup de la grosseur moyenne de ses granules sans qu'on puisse rien dire de très général concernant le sens de cette variation qui, pour un colloïde donné, peut se modifier avec la nature de l'électrolyte* ».

L'ensemble des faits ci-dessus nous a conduits à cultiver *B. caryocyanus* en milieu phéniqué à 0 gr. 25 0/00. A cette concentration, en effet, la croissance de *B. caryocyanus* paraît normale. Après 10 passages en eau peptonée phéniquée (chaque passage étant espacé de 4 à 7 jours), nous avons pro-

(1) De l'ordre de celle que j'ai réalisée.

(2) Par abréviation je désigne la différence de potentiel par les lettres : D. P.

cédé à la détermination de l'agglutinabilité des souches obtenues. Afin d'éviter tout apport d'acide phénique dans la suspension, les Bactéries ayant subi dix passages en milieu phéniqué sontensemencées sur gélose ordinaire non phéniquée et c'est à l'aide des plastides récoltées sur un tel milieu que nous avons réalisé les suspensions destinées à l'agglutination. Il est une particularité sur laquelle nous désirons tout d'abord attirer l'attention. Lorsqu'on ensemence sur gélose ordinaire des souches bactériennes ayant subi dix passages en milieu phéniqué, on constate le fait suivant. Après addition d'eau physiologique à la culture sur gélose non phéniquée et par un mouvement de va et vient, on arrive à enlever d'une seule pièce toute la culture sous forme d'un voile cohérent (1). Les Bactéries ainsi mises en suspension sont lavées 3 fois à l'eau physiologique et agitées très longtemps avec des billes de verre; mais même après des heures d'agitation on distingue encore à l'œil nu de gros amas. On procède alors à une centrifugation légère pour éliminer le plus possible les agglomérats de plastides. Cette cohésion particulière du voile s'explique par l'importance que prend la capsule en milieu phéniqué et qui persiste dans le premier passage sur gélose ordinaire. On obtient néanmoins une émulsion formée presque exclusivement d'éléments isolés. C'est à l'aide de ce matériel qu'il a été procédé à la recherche de la dilution limite d'agglutination. Le tableau suivant indique les résultats obtenus dans ces essais :

TABLEAU XXXVII

SYSTÈMES AGGLUTINANTS réalisés avec :	DILUTION LIMITE D'AGGLUTINATION
<i>B. caryocyaneus</i> cultivé dans des conditions normales.....	1/100.000
<i>B. caryocyaneus</i> ayant subi 10 passages sur milieu phéniqué.....	1/2.000

Loin d'avoir acquis une agglutinabilité plus grande par passage en milieu phéniqué, *B. caryocyaneus* présente une chute sensible de l'agglutina-

(1) Cette cohérence particulière du voile ne s'observe jamais dans les cultures normales de *B. caryocyaneus*.

bilité (1). C'est d'ailleurs un phénomène assez général, chaque fois que, par un artifice quelconque, on arrive à déterminer la formation d'amas dans une culture, on diminue l'agglutinabilité apparente du germe (2).

Le mécanisme de ce phénomène ne paraît pas avoir reçu d'explication satisfaisante jusqu'à ce jour.

CULTURE DE *B. caryocyanus* EN MILIEU LITHINÉ.

Nous avons vu que la culture en milieu lithiné détermine un accroissement considérable de la capsule; il est donc intéressant de rechercher si l'épaisseur de la couche externe de la membrane s'accompagne :

- 1) d'une variation de l'agglutinabilité;
- 2) d'une modification de la perméabilité de la membrane.

J'envisagerai successivement l'agglutinabilité et la perméabilité des plastides cultivées sur gélose lithinée. Ces recherches ont été faites en collaboration avec Ph. LASSEUR et P. VERNIER.

VARIATION DE L'AGGLUTINABILITÉ.

A cet effet des cultures de 40 heures effectuées les unes sur gélose peptone ordinaire ($\text{pH} = 7$), les autres sur gélose lithinée à 2 % sont mises en suspension dans l'eau physiologique. On procède alors à 3 lavages, puis à une homogénéisation des suspensions par agitation avec des billes de verre et à une centrifugation fractionnée. Il est à remarquer que la préparation de la suspension à partir des corps microbiens cultivés sur gélose lithinée offre de grandes difficultés. Comme avec les germes ayant subi 10 passages en eau peptonée phéniquée, le développement important pris par la capsule tend à réunir les plastides en colonies élémentaires dont la dissociation exige une agitation très longue et deux centrifugations fractionnées.

(1) Il est à remarquer que la suspension réalisée avec les Bactéries ayant subi 10 passages en eau peptonée phéniquée et un passage sur gélose ordinaire offre un pH égal à 6,93. Cette concentration en ions H^+ reste dans la zone des concentrations les plus favorables à l'agglutination de *B. caryocyanus*.

(2) Nous rappellerons que BOUTARIC a montré que la stabilité de certaines suspensions colloïdales n'est pas toujours en relation avec la dimension des particules de la phase dispersée et n'oublions pas, comme le faisait justement remarquer l'éminent physicien, que l'histoire des colloïdes comporte beaucoup plus d'exceptions que de généralisations. (Conférence faite au Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie, Nancy; fasc. IV, 1931.)

A l'aide des suspensions homogènes ainsi réalisées on procède alors à la détermination comparative des dilutions limites d'agglutination. Le tableau ci-dessous indique les valeurs obtenues avec les corps microbiens provenant de gélose ordinaire et de gélose lithinée en présence de sérum-*B. caryocyanus* normal.

TABLEAU XXXVIII

CORPS MICROBIENS provenant de :	DILUTION LIMITE D'AGGLUTINATION
Gélose ordinaire.....	1/80.000
Gélose lithinée à 2 %.....	1/8.000

Les corps microbiens cultivés sur gélose lithinée et de ce fait, pourvus d'une capsule très développée, sont donc beaucoup moins sensibles à l'action du sérum agglutinant que les corps bactériens récoltés sur gélose ordinaire.

Ce fait avait déjà été observé par SHIBAYAMA (1905), PORGES et PRANTSCHOFF (1906), STREIT (1906), HEITZ (1920). C'est ce qui ressort aussi d'une partie des expériences de DEFALLE (1902). Dans les recherches du savant belge, les Bactéries capsulées ont une agglutinabilité plus faible que le Bacille typhique. Il faut reconnaître cependant que dans ces mêmes expériences le Bacille de HERLA porteur d'une volumineuse capsule est plus agglutinable que le Bacille de FRIEDLANDER faiblement capsulé.

Etant donnée la résistance des Bactéries capsulées à l'action précipitante du sérum homologue, j'ai recherché si ces germes se comportaient de la même façon vis-à-vis des autres agents précipitants. Pour cela, des corps microbiens cultivés sur gélose ordinaire et sur gélose lithinée à 2 % ont été lavés à l'eau bidistillée, les plastides ainsi débarrassées de toute trace du milieu de culture ont été mises en suspension dans différents liquides dispersifs. On a déterminé ensuite la valeur de quelques facteurs d'action dont dépend la stabilité des suspensions. Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus :

TABLEAU XXXIX

ORIGINE des Bactéries utilisées	NATURE des liquides dispersifs	TENSION superficielle en dyne/cm à 21° C	DIFFÉRENCE de potentiel exprimée en millivolts	pH des suspensions	ASPECT micros- copique
Culture de 40 heures sur gélose ordinaire	Eau bidistillée	76,2	42,18		Plastides isolées
	Chlorure de calcium 0,2 0/00	76	21,93		Très petits amas
	Sulfate d'aluminium 0,1 0/00	76,2	15,66	4,21	Amas moyens petits amas formes isolées
	Acide sulfurique N/10.000	76	31,33	3,97	Plastides isolées
Culture de 40 heures sur gélose lithinée à 2 %	Eau bidistillée	73,2	40,62		Plastides isolées
	Chlorure de calcium 0,2 0/00	63	21,93		Nombreux petits amas
	Sulfate d'aluminium 0,1 0/00	72,7	pas de transport appréciable	4,31	Gros amas
	Acide sulfurique N/10.000	72,6	24,37	4,54	Amas moyens

L'examen de ce tableau montre que la tension superficielle des suspensions effectuées avec les corps microbiens cultivés sur gélose lithinée est plus basse que la tension superficielle des suspensions réalisées avec des germes cultivés sur gélose nutritive ordinaire. Considérons maintenant la charge électrique des plastides provenant respectivement de gélose lithinée et de gélose ordinaire. On constate que pour ces deux catégories de plastides la vitesse de transport est du même ordre de grandeur lorsqu'on utilise

comme liquide dispersif l'eau ou les solutions de chlorure de calcium. Par contre la charge des plastides provenant de gélose lithinée est plus faible que celle des corps microbiens témoins lorsqu'on emploie les solutions de sulfate d'aluminium ou les solutions N/10.000 d'acide sulfurique comme milieu dispersif. L'examen microscopique des différents systèmes montre que les plastides provenant de gélose lithinée sont plus sensibles à l'action précipitante des ions H^+ et Al^{+++} que les plastides cultivées sur gélose ordinaire. Il faut donc bien se garder de généraliser et de poser en principe que les suspensions de Bactéries provenant du milieu lithiné sont plus ou moins stables que les suspensions effectuées avec des plastides récoltées sur milieu usuel, tout dépend de l'agent précipitant avec lequel on les met en présence.

MODIFICATION DE LA PERMÉABILITÉ DE LA MEMBRANE.

L'importance prise par la capsule de *B. caryocyanus* en milieu lithiné pouvait déterminer une modification de la perméabilité de la membrane. Nous nous sommes efforcés de suivre ces variations possibles par des mesures de conductibilité de diverses suspensions à des temps variables.

Les mesures de conductibilité doivent être assez précises pour que la diffusion ou l'adsorption d'une faible quantité d'électrolytes soit enregistrée facilement. Tout le monde connaît l'importance du coefficient personnel dans les lectures au téléphone. C'est pourquoi, sur les conseils de M. PIÉRRET et grâce à la collaboration de M. JOINVILLE nous avons substitué la lecture au haut parleur (1) à la lecture au téléphone à l'aide d'un amplificateur basse fréquence à 4 lampes. Ce dispositif permet d'apprécier des déplacements du curseur de l'ordre du demi-millimètre pour des résistances variant de 200 à 20.000 ohms. L'obtention de telles résistances exige l'emploi de solutions de concentrations convenables en électrolytes. A titre de contrôle, il était cependant nécessaire de mesurer les conductibilités des suspensions effectuées dans l'eau bidistillée. De plus, on sait que les ions à charge simple, double ou triple, peuvent se comporter différemment vis-à-vis d'une phase dispersée, c'est la raison pour laquelle nous avons utilisé des solutions de chlorure de sodium, de chlorure de calcium, de sulfate d'aluminium et diverses solutions de soude et d'acide sulfurique.

(1) Un an avant nous, M. LECOMTE DU NOUY (1931) avait réalisé une installation similaire.

Le tableau ci-dessous indique quelques-unes des valeurs obtenues :

TABLEAU XL

NUMÉROS des systèmes	GERMES provenant de cultures sur gélose	NATURE du liquide dispersif	CONDUCTIBILITÉ SPÉCIFIQUE à 25° C	
			après les temps :	
			0	5 heures
1	ordinaire	eau bidistillée	$14,1.10^{-6}$	$15,01.10^{-6}$
2	lithinée		$12,6.10^{-6}$	$17,2.10^{-6}$
3	ordinaire	solution de chlorure de calcium à 0,2 0/0	$1856,6.10^{-6}$	$2046,3.10^{-6}$
4	lithinée		$1858,06.10^{-6}$	$2005. 10^{-6}$
5	ordinaire	solution de chlorure de calcium à 0,2 0/00	$232,1.10^{-6}$	$251,6.10^{-6}$
6	lithinée		$217,6.10^{-6}$	$237,9.10^{-6}$
7	ordinaire	solution de sulfate d'aluminium à 0,1 0/0	$534,6.10^{-6}$	$594,3.10^{-6}$
8	lithinée		$530,2.10^{-6}$	$587,1.10^{-6}$
9	ordinaire	solution de sulfate d'aluminium à 0,1 0/00	$107,5.10^{-6}$	$119,8.10^{-6}$
10	lithinée		$103,3.10^{-6}$	$111,9.10^{-6}$

Lorsqu'on transporte des plastides provenant d'une jeune culture dans de l'eau bidistillée, il faut s'attendre à ce qu'il diffuse de la plastide une certaine quantité d'électrolytes. Les nombres observés dans nos conditions d'expérience sont relativement voisins les uns des autres et étant donnée la précision des mesures pour les résistances variant de 20.000 à 100.000 ohms, il faut être prudent dans l'interprétation des résultats. Sous ces réserves, nous constatons que dans l'eau bidistillée les plastides entourées d'une capsule laissent diffuser beaucoup plus facilement des substances ionisables que les éléments dépourvus de capsule. Dans tous les autres cas, excepté dans les expériences 5 et 6, les germes cultivés sur gélose lithinée

laissent moins diffuser de substances ionisables que les plastides provenant de gélose ordinaire.

L'interprétation des faits observés soulève plus d'une difficulté. Nous allons essayer d'expliquer les phénomènes en commençant par le cas le plus simple, celui des solutions de sulfate d'aluminium. L'examen macroscopique et l'examen microscopique ont montré que les plastides capsulés précipitent beaucoup plus facilement par le sulfate d'aluminium que les corps bactériens normaux. De plus, les mesures de transport indiquent un plus grand abaissement de la charge électrique chez les Bactéries capsulées que chez les germes provenant de gélose ordinaire. On conçoit que des abaissments différents de la charge électrique puissent coïncider avec des différences de perméabilité de la membrane.

C'est dans l'eau bidistillée que l'on observe les plus grandes variations dans la diffusion des substances ionisables, puisque celle-ci varie de 6 % (plastides normales) à 26 % (plastides capsulés). On peut évidemment admettre que les ions Li^+ ont été adsorbés en assez grande quantité lors du séjour des plastides en milieu lithiné, et que, lorsque ces dernières ont été transportées dans l'eau pure il y a eu désorption d'une quantité d'ions beaucoup plus grande que dans le cas des germes cultivés sur un milieu de minéralisation normale.

Le rapport de P. GIRARD (1929) et la récente revue d'HÖBER (1930) montrent combien est complexe le problème de la perméabilité de la membrane, aussi, en ce qui concerne nos expériences, nous en tiendrons-nous aux faits, en attendant que ceux-ci se multiplient suffisamment pour nous permettre une généralisation.

*VARIATION DU POUVOIR AGGLUTINOGENE ET
DE L'AGGLUTINABILITE DES DIFFERENTES RACES
ET SOUCHES DE B. CARYOCYANEUS.*

Nous avons vu antérieurement (1930) (1) qu'il était possible d'obtenir des modifications durables ou temporaires (race fluorescente, race incolore) de *B. caryocyaneus*. Nous avons été ainsi conduits à préparer des Lapins, non seulement avec *B. caryocyaneus* désigné sous le nom de type normal (ou type B), mais aussi avec sa modification durable ou race fluorescente. Les cultures de cette race fluorescente avaient été obtenues, les unes par

(1) En collaboration avec M. le Professeur LASSEUR et J. MARCHAL.

isolement ordinaire sur plaque de gélose et sont appelés Fo dans le tableau ci-dessous, les autres isolées à l'aide du dispositif décrit dans le fascicule IV des Travaux du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy (p. 95, 1931) sont désignées sous la rubrique Fu.

Le tableau suivant résume les résultats obtenus avec les différents sérums sur *B. chlororaphis*, car nous verrons plus loin que ce germe est coagglutiné par le sérum-*B. caryocyaneus*.

TABLEAU XLI

DÉSIGNATION du sérum expérimenté	DÉSIGNATION DES BACTÉRIES soumises à l'agglutination	DILUTION limite d'agglutination
	<i>B. caryocyaneus</i> Fu	1/56.000
Sérum	<i>B. caryocyaneus</i> B	1/48.000
<i>B. caryocyaneus</i>	<i>B. caryocyaneus</i> race achromogène	
Fo	(42° passage à 40° C)	1/56.000
	<i>B. chlororaphis</i>	1/500
	<i>B. caryocyaneus</i> Fu 29	1/64.000
Sérum	<i>B. caryocyaneus</i> Fu 33	1/80.000
<i>B. caryocyaneus</i>	<i>B. caryocyaneus</i> race achromogène	
Fu	(43° passage à 40° C)	1/72.000
	<i>B. caryocyaneus</i> B	1/72.000
	<i>B. chlororaphis</i>	1/600
	<i>B. caryocyaneus</i> Fu	1/100.000
Sérum	<i>B. caryocyaneus</i> B 34	non limite
		1/100.000
		non limite
<i>B. caryocyaneus</i>	<i>B. caryocyaneus</i> B 41	1/80.000
		non limite
B	<i>B. caryocyaneus</i> race achromogène	
	(3° passage à 40° C)	1/80.000
		non limite
	<i>B. chlororaphis</i>	1/800

Il résulte de l'ensemble des recherches résumées dans le tableau ci-dessous que *B. caryocyaneus* type normal possède le pouvoir agglutinogène le plus élevé, par contre l'agglutinabilité de la race fluorescente et de la race achromogène sont du même ordre que l'agglutinabilité du type normal. Ce tableau montre aussi une variation de l'agglutinabilité avec les différentes

souches de la même race, il s'ensuit que toute recherche de la modification de l'agglutinabilité doit comporter une expérience témoin. De plus, *B. caryocyaneus* Fu est doué d'un pouvoir agglutinogène supérieur à celui de *B. caryocyaneus* Fo. Nous retrouvons là encore la notion de biotype au sens de CUÉNOT. Rappelons à ce propos que MERCIER et LASSEUR (1911) ont pour la première fois transporté la notion de biotype en Microbiologie.

Le tableau ci-dessus peut être envisagé à un autre point de vue, celui du rapport entre l'agglutination homologue et l'agglutination hétérologue.

Si on établit un rapport entre les dilutions limites d'agglutination d'un sérum donné vis-à-vis du germe homologue et du germe hétérologue (*B. chlororaphis*), on obtient dans le premier cas : (sérum Fo) $\frac{56.000}{500} = 11,2$;

dans le deuxième cas : (sérum Fu) $\frac{64.000}{600} = 10,6$ et dans le troisième

cas : (sérum B) $\frac{100.000}{800} = 12,5$. Ces rapports sont pratiquement du même ordre de grandeur.

AGGLUTINATION HETEROLOGUE.

COAGGLUTINATION.

Lors des premières recherches sur l'agglutination, on posait en principe qu'un sérum A n'agglutinait que le germe homologue A. Puis on s'est aperçu que le sérum A pouvait agglutiner non seulement le germe homologue A, mais encore des Bactéries très voisines A₁, A₂, A₃, etc... Le sérum A agglutinait A₁, A₂, A₃ à des taux différents, et dans la majorité des cas, la plus grande dilution limite d'agglutination s'observait pour le germe homologue A. Ce fait frappa beaucoup les microbiologistes, car dans leur esprit, il portait atteinte à la doctrine de la spécificité. Tout dépend de la façon dont on comprend le problème et on pourrait inverser la proposition en disant que le phénomène de CHARRIN et ROGER a décelé des « *parentés humorales* », parentés que ni la morphologie, ni les caractères de culture ne permettaient de soupçonner. C'est généralement sous ce second aspect que les biologistes et les naturalistes envisagent la question.

M. NICOLLE explique le phénomène en admettant qu'une plastide bactérienne n'est pas constituée par un seul antigène, mais par une mosaïque d'antigènes, ce que nous schématisons en prenant l'exemple concret suivant :

Considérons 2 plastides P₁ et P₂, la plastide P₁ renferme les antigènes

A₁, A₂, A₃, A₄, B₁ ... la plastide P₂ renferme les antigènes B₁, B₂, B₃, B₄... Les deux plastides ont donc un antigène commun B₁ ne représentant qu'une fraction de l'antigène total et par conséquent B₁ donnera une réaction d'intensité beaucoup plus faible que la réaction effectuée avec la somme des antigènes A₁, A₂, A₃, A₄, B₁. Il faut aussi envisager le cas où B₁ représente quantitativement la partie dominante des antigènes. Dans ce cas, les dilutions limites d'agglutination avec les germes homologues et hétérologues doivent être très voisines. Si la partie antigénique B₁ ne représente qu'une faible partie de l'antigène total, les dilutions limites d'agglutination des germes homologues et hétérologues seront très différentes.

Lorsqu'on ramène les réactions anticorps à des réactions d'adsorption, on n'éprouve aucune difficulté à expliquer le phénomène de coagglutination. On sait, en effet, qu'en tant que phénomène physique (1), l'adsorption se manifeste toujours sous réserve de surface de contact suffisante, mais l'intensité de la réaction varie avec les corps mis en présence. Et lorsqu'on exprime le pouvoir adsorbant par des nombres, on voit le pouvoir adsorbant d'une même substance vis-à-vis de différents corps varier par exemple dans des proportions de 1 à 10, 1 à 20, 1 à 100...

Quoiqu'il en soit des hypothèses, il faut reconnaître que l'agglutination hétérologue est un phénomène assez fréquent, seul l'ordre de grandeur varie. Tantôt elle est trop faible pour être perçue à l'aide des techniques habituelles, tantôt elle est assez intense pour constituer la coagglutination des bactériologistes. Quelquefois encore elle peut atteindre les valeurs de l'agglutination homologue.

Dans des recherches précédentes LASSEUR, HURIET et MOREL (1928), ont constaté que l'agglutination hétérologue augmente dès que l'on passe des Bactéries asporogènes aux Bactéries sporogènes du groupe *subtilis* — *mesentericus* — *megatherium*.

C'est pourquoi j'ai été conduite à rechercher les dilutions limites d'agglutination du sérum *B. caryocyaneus* pour les Bactéries qui présentent des caractères morphologiques ou culturels très voisins de ceux que l'on observe avec *B. caryocyaneus*. Mes essais ont donc porté sur des Bactéries sécrétant un pigment fluorescent (Bactéries fluorescentes) et des corps colorés bleus (*B. pyocyaneus* var. *pyocyanogenes* et *B. cyaneo-fluorescens*).

Pour cela, dans une série de tubes A, B, C, D..., on distribue 2 cm³ de

(1) L'adsorption a été aussi envisagée au point de vue chimique.

suspension. (1) puis on dilue le sérum agglutinant dans l'eau physiologique. On réalise ainsi des dilutions variant du 1/25 au 1/60.000. Au tube A, on ajoute 2 cm³ de sérum dilué au 1/25, au tube B, 2 cm³ de sérum dilué au 1/50 et ainsi de suite.

On détermine de cette façon la valeur approximative de la coagglutination. Les dilutions effectuées suivant une progression géométrique ont le grand inconvénient de donner des valeurs très éloignées les unes des autres, par exemple : l'agglutination s'observe à la dilution 1/400 et elle fait défaut à la dilution 1/800. Il y a entre ces deux valeurs une marge trop grande et pour préciser la dilution limite d'agglutination, il faut alors procéder à une seconde série d'opérations avec des dilutions de l'ordre du 1/400, 1/500, 1/600, 1/700, 1/800.

Le tableau ci-dessous indique les dilutions limites d'agglutination du sérum-*B. caryocyaneus* pour quelques Bactéries fluorescentes.

TABLEAU XLII

DÉSIGNATION DES BACTÉRIES expérimentées	DILUTION limite d'agglutination
<i>B. chlororaphis</i> GUIGNARD et SAUVAGEAU, 1894.....	1/800
Bacille fluorescent liquéfiant de CHAPMEN (<i>in litt.</i>)....	1/100
Bacille fluorescent liquéfiant HIRBQUELLWASSER (<i>in litt.</i>)..	1/100
<i>B. cyaneo-fluorescens</i> ZANGEMEISTER, 1895.....	0
<i>B. pyocyaneus</i> var. <i>pyocyanogenes</i> GESSARD, 1882.....	0
Bacille fluorescent du mucus nasal JAISER (<i>in litt.</i>).....	0
<i>B. fluorescens putidus</i> FLUGGE, 1886.....	0
<i>B. cyanogenus</i> FLUGGE, 1886.....	0
Bacille fluorescent pathogène pour les plantes ZACH. (<i>in litt.</i>).....	0
<i>B. fluorescens albus</i> ZIMMERMANN, 1890.....	0
<i>B. fluorescens aureus</i> ZIMMERMANN, 1890.....	0
<i>B. caryocyaneus</i> BEIJERINCK-DUPAIX, 1930.....	1/102.400

Le sérum de Lapin préparé avec *B. caryocyaneus*, a donc la propriété d'agglutiner à un taux élevé *B. chlororaphis* (1/800) et à un taux plus

(1) Les suspensions sont réalisées suivant la technique habituelle : après 3 lavages à l'eau physiologique, des corps microbiens [provenant d'une culture de 40 heures sur gélose peptone (pH = 7)], on procède à une agitation avec des billes de verre et à une centrifugation fractionnée. La concentration finale des suspensions en Bactéries est de 4 milliards de germes par centimètre cube.

faible (1/100), le Bacille fluorescent liquéfiant de CHAPMEN et le Bacille fluorescent liquéfiant HIRBQUELLWASSER. Cette dernière dilution limite est celle que l'on observe souvent lorsqu'on étudie la coagglutination dans le groupe des Bactéries fluorescentes. Les autres germes expérimentés ne sont pas influencés par les agglutinines-*B. caryocyaneus*.

Ce phénomène d'agglutination hétérologue ou coagglutination ne peut guère être interprété qu'en ayant recours à la réaction de CASTELLANI, connue le plus souvent sous le nom de réaction de saturation des agglutinines.

RÉACTION DE CASTELLANI

Ainsi que le fait judicieusement remarquer M. le Professeur LASSEUR, l'expression de saturation des agglutinines n'est pas très heureuse et il est préférable de lui substituer celle de réaction de CASTELLANI (cours de Microbiologie). En effet, on s'efforce bien de réaliser la saturation des agglutinines, mais elle n'est obtenue que dans des conditions bien déterminées : celles réalisées en opérant dans la zone des faibles concentrations en agglutinines.

Dans ces systèmes où la réaction est (ou paraît être) totale, il est possible, sous réserve d'utiliser une quantité convenable de corps microbiens, de dépouiller le sérum de toutes ses agglutinines. Il n'en est plus de même lorsqu'on s'adresse à la zone des fortes concentrations, dans ce cas, la réaction est limitée. Lorsqu'on détermine la quantité d'anticorps fixée en fonction de doses croissantes d'antigène, l'anticorps restant constant, on constate que la quantité d'anticorps ne croît avec la quantité d'antigène que jusqu'à une certaine concentration. A partir de cette concentration la quantité d'anticorps fixée reste sensiblement constante, elle est indépendante de la concentration en antigène (1). Dans ces zones de concentration, on aura des

rapports $\frac{\text{agglutinine fixée}}{\text{agglutinine libre}}$ variables avec l'expérience ; mais dans aucun cas, on n'arrivera à fixer toute l'agglutinine du sérum. Pour priver complètement le sérum de tous les anticorps, il faut centrifuger, éliminer les corps bactériens qui ont déjà fixé une partie des agglutinines puis au liquide décanté, ajouter une nouvelle quantité d'éléments bactériens. Si le liquide décanté correspond à la zone des faibles concentrations en agglutini-

(1) Parfois il existe même un maximum de fixation et au delà d'une certaine teneur en antigène, la quantité d'anticorps fixée décroît à mesure que croît la concentration en antigène.

nes, le deuxième apport de corps microbiens lui fait perdre la totalité de ses agglutinines, il n'en est plus de même si le liquide décanté est encore assez riche en agglutinines. Dans ce cas, la deuxième addition de corps microbiens ne le prive que d'une portion plus ou moins importante de ses agglutinines. Il reste encore des anticorps dans le sérum et pour les éliminer il faut, pour la troisième fois, ajouter des corps microbiens au sérum.

LASSEUR estime que la réaction de CASTELLANI ne doit être effectuée que sur des sérums convenablement dilués. Les techniques décrites dans les ouvrages classiques sont donc entachées d'erreur, car elles utilisent en général des corps microbiens non lavés, c'est-à-dire un mélange de plastides et de milieu de culture. Dans ce mélange, la quantité de milieu de culture est extrêmement variable d'une expérience à l'autre. Tout le monde connaît le rôle des électrolytes et des substances stabilisantes dans l'agglutination. Il ne faut donc pas s'étonner si les corps microbiens lavés et non lavés se comportent de façons différentes. D'ailleurs l'apport d'une quantité indéterminée de corps microbiens produit une augmentation du volume total dont il est impossible de tenir compte. De plus, les réactions anticorps pouvant être ramenées à des actions de surface, il n'est pas indifférent que les plastides soient isolées les unes des autres ou tassées en amas plus ou moins compacts (1). Ce sont ces raisons qui m'ont fait adopter la technique préconisée par LASSEUR, et qui peut se résumer de la façon suivante :

- 1) dilution convenable des sérums ;
- 2) préparation, après lavage, des purées microbiennes parfaitement homogènes (au sens bactériologique (2) du mot) ;
- 3) mise en contact dans des vases de verre résistant ;
- 4) centrifugation ;
- 5) recherche du pouvoir agglutinant du liquide décanté.

(1) Cette action de surface a été observée non seulement avec les Bactéries, mais avec des cellules beaucoup plus grandes. Lorsqu'on met des globules rouges en présence de concentrations croissantes de certaines substances, on constate les faits suivants : pour les zones des faibles et moyennes concentrations, la quantité de substance S fixée croît avec la concentration du système en substance S, jusqu'à une certaine concentration. Puis la quantité de substance fixée décroît à mesure que croît la concentration du système en substance S. La diminution de la fixation correspond à l'agglutination des globules rouges. Si par agitation on détruit les amas d'hématies, on constate que la quantité de substance S fixée croît avec la concentration du système en substance S.

(2) Un physicien serait en effet étonné d'entendre parler de suspensions homogènes. Les Bactéries ne se distribuent pas dans un liquide dispersif comme le font des molécules ou des ions. Aussi par l'expression de « *suspension homogène* » nous voulons désigner une suspension où les Bactéries sont parfaitement isolées les unes des autres.

Les résultats obtenus dans cette série d'essais sont résumés dans le tableau ci-dessous :

· TABLEAU XLIII

SYSTÈMES DE SATURATION	DILUTION LIMITE D'AGGLUTINATION du sérum saturé ou non mis en présence de		
	<i>B. caryocya-</i> <i>neus</i> (B) (1)	<i>B. caryocya-</i> <i>neus</i> (Fu)(1)	<i>B. chloro-</i> <i>raphis</i>
Sérum <i>B. caryocyanus</i> (B) mis au contact de plasti- des <i>B. caryocyanus</i> (B).	1/160		0
Sérum <i>B. caryocyanus</i> (B) mis au contact de plasti- des de <i>B. chlororaphis</i> ...	1/32.000		0
Sérum <i>B. caryocyanus</i> (B) non saturé. Témoin.....	1/100.000		1/800
Sérum <i>B. caryocyanus</i> (Fu) mis au contact de plasti- des <i>B. caryocyanus</i> (Fu)		0	0
Sérum <i>B. caryocyanus</i> (Fu) mis au contact de plasti- des <i>B. chlororaphis</i>		1/80.000	0
Sérum <i>B. caryocyanus</i> (Fu) non saturé. Témoin.....		1/80.000 non limité	1/600

Il résulte de ces expériences que la saturation de l'agglutinine-*B. caryocyanus* fait disparaître le pouvoir agglutinant du sérum pour *B. chlororaphis*. C'est là un fait qui était facile à prévoir ; mais il est un point tout particulier sur lequel il faut insister. Dans certains essais, la saturation des agglutinines par *B. chlororaphis* a entraîné une chute du pouvoir agglutinant du sérum pour le germe homologue. En d'autres termes, tout se passe comme s'il y avait eu fixation d'agglutinine-*B. caryocyanus* par *B. chlororaphis*. Ce fait est parfaitement conforme avec la théorie moderne de l'agglutination et s'il ne s'observe pas dans toutes les expériences, cela tient vraisemblablement à ce qu'il y a une différence trop grande entre deux dilutions consécutives constituant l'échelle de titrage.

(1) Par l'expression de *B. caryocyanus* (B), je veux désigner la forme normale de cette Bactérie et par celle de *B. caryocyanus* (Fu) la modification fluorescente obtenue à partir d'une seule plastide.

AGGLUTININES MULTIPLES.
SÉRUMS PROVENANT D'ANIMAUX PRÉPARÉS
AVEC PLUSIEURS ANTIGÈNES

Si la théorie de la synergie des anticorps (WEINBERG et ses Collàborateurs, 1928) est exacte, on doit pouvoir, à l'aide de *B. caryocyaneus*, germe hautement agglutinogène, exalter le pouvoir agglutinant du sérum d'animaux préparés avec des germes doués d'un faible pouvoir agglutinogène, tels que *B. pyocyaneus pyocyanogenes*, *Torula colliculosa*, étudiés par mon excellente compagne Renée LÉCAILLE. Le lecteur trouvera des renseignements détaillés dans la thèse de Mlle LÉCAILLE (1). Je me contenterai de résumer quelques-uns des résultats obtenus.

TABLEAU XLIV

Agglutinines multiples. — Sérum A.

Sérum préparé avec *B. caryocyaneus* (B), *B. pyocyaneus pyocyanogenes*,
Torula colliculosa.

SYSTÈME DE SATURATION	DILUTION LIMITE D'AGGLUTINATION du sérum saturé ou non mis en présence de plastides			
	<i>B. caryo- cyaneus</i> (B)	<i>B. pyocya- neus pyocya- nogenes</i>	<i>Torula colliculosa</i>	<i>B. chloro- raphis</i>
Sérum A mis au contact de plastides <i>B. caryocya- neus</i> (B) BEIJERINCK- DUPAIX	0	1/38.400	1/600	
Sérum A mis au contact de plastides <i>B. pyocya- neus pyocyanogenes</i> GES- SARD.....		1/600	1/600	
Sérum A mis au contact de cellules <i>Torula col- liculosa</i> HARTMANN ...		1/38.400	0	
Sérum A non saturé (té- moin.....)	1/3.200	1/38.400	1/600	1/100

(1) Thèse pharmacie, Nancy 1932.

La conclusion la plus importante qui découle de cette première série d'expériences est la suivante : la saturation par un des germes ayant servi à la préparation des animaux ne détermine une chute du pouvoir agglutinant que pour le germe qui a servi à la saturation. Le sérum conserve sensiblement ses propriétés agglutinantes pour les autres microbes utilisés dans la préparation des animaux.

Dans une deuxième série d'expériences, les animaux ont été préparés avec un mélange de suspensions de trois Bactéries fluorescentes : *B. caryocyaneus* (B), *B. pyocyaneus* var. *pyocyanogenes* et *B. chlororaphis*. Le tableau ci-dessous indique les dilutions limites d'agglutination du sérum obtenu pour chacune de ces espèces bactériennes.

TABLEAU XLV

Agglutinines multiples. — Sérum B.

Sérum préparé avec *B. caryocyaneus* (B), *B. pyocyaneus pyocyanogenes*,
B. chlororaphis.

ACTION DU SÉRUM B (agglutinines multiples) sur :	DILUTION LIMITE D'AGGLUTINATION
<i>B. caryocyaneus</i> (B).....	1/6.000
<i>B. pyocyaneus</i> var. <i>pyocyanogenes</i>	1/64.000
<i>B. chlororaphis</i>	1/1.000

L'ensemble de ces recherches montre que l'inoculation simultanée de *B. caryocyaneus* (B), *B. pyocyaneus* var. *pyocyanogenes* et *B. chlororaphis* permet d'obtenir un sérum agglutinant *B. pyocyaneus* var. *pyocyanogenes* à un taux beaucoup plus élevé que le sérum des animaux préparés avec *B. pyocyaneus* var. *pyocyanogenes* seul. Mais, par une sorte de balancement de la loi de compensation, la production d'agglutinines se trouve diminuée pour *B. caryocyaneus* et *B. chlororaphis*, la diminution est surtout considérable pour *B. caryocyaneus*.

Que vis-à-vis d'un mélange de germes, l'organisme ne réagisse pas comme il le fait à l'égard d'un des germes constituant ce mélange, c'est là, il me semble, un fait non prévisible (1) et une conclusion très importante en ce qui concerne les réactions d'immunité ou de défense. C'est d'ailleurs un point dont je poursuis l'étude en collaboration avec M. le Professeur LASSEUR.

(1) Du moins d'après les idées admises actuellement.

BIBLIOGRAPHIE

- ACHARD et BENSAUDE. — *C. R. Soc. biol.*, T. 48, p. 940, 1896.
- ALMAGIA (M.). — *Archiv. f. Hyg.*, Bd. 59, 1906.
- BEHAM (L.-M.). — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Bd. 66. Heft. 1, p. 110-120, 1912.
- DA COSTA CRUZ (J.). — *C. R. Soc. biol.*, T. 100, p. 932, 942, 958, 1929.
- CASTELLANI (A.). — *Zeitschr. f. Hyg.*, Bd. 40, p. 1, 1902.
- DEFALLE (N.). — *Ann. Inst. Past.*, T. 16, p. 156, p. 594, 1902.
- EISENBERG et VOLK. — *Zeitschr. f. Hyg.*, Bd. 46, p. 155, 1902.
- EISLER et PORGES. — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Bd. 42, p. 660, 1906.
- FITZGERALD (J.-G.). — *Proceed. of the soc. f. exp. biol. and med.*, T. X, p. 52, 1912.
- FÖRSTER (O.). — *Zeitschr. f. Hyg.*, Bd. 24, p. 500-529, 1897.
- FRIENDZEL (J.) et SZYMANOWSKI (Z.). — *C. R. Soc. biol.*, T. XCIX, p. 1149-1150, 1928.
- HEITZ (J.). — *Thèse Pharmacie Nancy*, 268 pages, 1920.
- LASSEUR (Ph.) et VERNIER (P.). — *Bull. Soc. Sc.*, Nancy, p. 121, 1924.
- LASSEUR (Ph.) et NOBLAT (A.-M.). — *Trav. Laborat. Microbiol.* Faculté de Pharmacie Nancy, fasc. I, p. 63-85, 1928.
- LASSEUR (Ph.), HURIET (J.) et MOREL (M.). — *Trav. Laborat. Microbiol.* Faculté Pharmacie Nancy, fasc. I, p. 125-136, 1928.
- LASSEUR (Ph.) et DUPAIX (A.). — *Archiv f. Mikrobiol.*, Bd. I, Heft. I, p. 137-164, 1930.
- LASSEUR et LÉCAILLE (R.). — *Trav. Laborat. Microbiol.*, Faculté Pharmacie Nancy, fasc. III, p. 179-189, 1930.
- LASSEUR (Ph.) et DUPAIX (A.). — *Trav. Laborat. Microbiol.* Faculté Pharmacie Nancy, fasc. IV, p. 201-205, 1931.
- LASSEUR (Ph.), VERNIER (P.) et DUPAIX (A.). — *Trav. Laborat. Microbiol.* Faculté Pharmacie Nancy, fasc. V, p. 143-150, 1932.
- LASSEUR (Ph.), DUPAIX (A.) et GROJEAN (M.). — *Trav. Laborat. Microbiol.* Faculté Pharmacie Nancy, fasc. V, p. 151-160, 1932.
- LÉCAILLE (R.). — *Thèse Pharmacie*, Nancy, 131 pages, 1932.
- NICOLLE (Ch.). — *C. R. Soc. biol.*, T. 12, p. 1054, 1898.
- NICOLLE (Ch.) et TRENEL (M.). — *Ann. Inst. Past.*, T. 16, p. 562, 1902.
- NOBLAT (A.-M.). — *Thèse Pharmacie*, Nancy, 114 pages, 1929.
- PORGES (O.). — *Wien. klin. Wochenschr.*, p. 691, 1905, *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Bd. 40, p. 133-150, 1905.
- PORGES (O.) et PRANTSCHOFF. — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Bd. 41, p. 466, 546, 658, 1906.
- PROCHAZKA (J.). — *C. R. Soc. biol.*, T. CIV, p. 387-389, 1930.
- SACQUEPÉE (E.), LIÉGEAIS (M.) et FRICKER (J.). — *C. R. Soc. biol.*, T. C, p. 1187-1189, 1929.
- STREIT. — *Centralbl. f. Bakt.*, Bd. 40, p. 709, 1906.

- TOENNIESSEN (E.). — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Orig., Bd. 75, p. 329, 1915.
WEINBERG (M.) et PRÉVOT (A.-R.). — *C. R. Soc. biol.*, T. XCIX, p. 569-570, 1928.
WEINBERG (M.), DAVESNE (J.) et SANCHEZ (C.). — *C. R. Soc. biol.*, T. XCIX, p. 1824-1827, 1928.

RECHERCHE DES AGGLUTININES CHEZ LES VÉGÉTAUX SOUMIS A DES INJECTIONS DE *B. CARYOCYANEUS*

GÉNÉRALITÉS

Depuis la première observation de BENEDICT PREVOST (1807) sur la Carie du Blé, de nombreux travaux ont établi le rôle des Champignons et des Bactéries en pathologie végétale, mais on ne trouve que peu de recherches expérimentales se rapportant à la connaissance du mécanisme de défense des végétaux contre les agents pathogènes.

Si KISSLING (1889) et E. LAURENT (1899) signalent quelques facteurs de prédisposition ou de résistance des plantes aux parasites, il faut arriver au magistral article de VUILLEMIN (1895) pour voir esquisser une véritable doctrine de l'immunité des végétaux et préciser « *les maladies de l'irritabilité* ».

En 1895, CHARRIN établit un parallèle entre la pathologie végétale et la pathologie animale. Pour ce savant, la résistance des plantes à l'infection est due aux obstacles mécaniques réalisés par la membrane et à l'action des sucs cellulaires. METCHNIKOV (1901), le créateur de la théorie phagocytaire, explique la résistance des végétaux par des influences chimiques. Et ce n'est qu'en 1909 que Noël BERNARD attire l'attention sur un facteur nouveau dans l'immunité végétale : la phagocytose ou digestion intracellulaire. « *...il peut paraître vraisemblable que, dans le cas des maladies cryptogamiques comme dans celui de la symbiose, certaines cellules soient capables d'enrayer d'abord la progression des Champignons en leur imposant des modes de végétation anormaux et de les détruire ensuite par phagocytose. L'existence de propriétés de ce genre, qui paraissent assez générales, fait pressentir qu'il n'y a pas un abîme infranchissable entre les moyens de défense des plantes et ceux des animaux contre les parasites* ». (Noël BERNARD).

Malheureusement, une mort implacable priva bientôt l'humanité d'un de ses plus nobles enfants. Mais Mme N. BERNARD se devait de poursuivre l'œuvre du grand disparu, et dans cette famille de savants biologistes, J. MAGROU généralisa bientôt la théorie de Noël BERNARD. L'éminent pas-

torien (J. MAGROU, 1921) étudia en détail la phagocytose des endophytes symbiotiques de diverses plantes.

Les recherches de SCHLICHT, JANSE, DANGEARD et ARMAND, MAC DOUGAL, CHODAT, SHIBATA, PETRI, GALLAND, BEAUVÉRIE, ZACH, MAGROU contribuèrent à préciser « *la connaissance de ces phénomènes intracellulaires* » P. NOBÉCOURT, 1928, p. 24).

Si certains auteurs, KIRCHNER (1916), BUTTLER (1918), en particulier, ont cru devoir établir une relation entre la résistance à l'infection et l'acidité de l'hôte, PANTANELLI (1921), par une critique serrée des faits, a montré que les facteurs de l'immunité des végétaux sont bien plus complexes.

Déjà, en 1902, MARSHALL WARD considérait les facteurs d'immunité comme étant d'ordre physiologique. La réceptivité ou la sensibilité à l'infection étaient sous la dépendance de la formation d'anticorps et de la sécrétion de « *corps positivement ou négativement chimiotropiques pour le parasite* » (NOBÉCOURT). Cette théorie physiologique a été reprise et complétée (anticorps) par PICADO (1921), CARBONE (1923-1925-1930) et ARNAUDI (1925-1930) de la célèbre Ecole italienne. Ces savants étudièrent particulièrement bien le rôle des anticorps. A peu près vers la même époque, en France, NOBÉCOURT (1928) synthétisa l'état de la question de l'immunité chez les végétaux dans une magnifique revue qui connut un légitime succès.

Je pourrais faire une énumération beaucoup plus longue de savants, mais mon but n'est pas de faire la bibliographie de cette question. Je veux simplement signaler les théories qui furent émises pour interpréter la résistance variable des végétaux à l'infection et expliquer comment j'ai été conduit à rechercher les agglutinines chez *Opuntia*.

La production d'agglutinines spécifiques chez *Opuntia* a été tour à tour affirmée par PICADO (1921) et niée par SARDINA (1926), NOBÉCOURT (1927). Les agglutinines normales ou « *pseudo-anticorps* » de CARBONE et ARNAUDI (1930) ont été constatées par VIGLIANO (1922) chez des plants d'*Opuntia* non infectés.

Cette discordance dans les résultats doit vraisemblablement être imputable à ce que les causes d'erreur interviennent inégalement dans les différents groupes d'expériences considérées.

C'est pour ces raisons que j'ai étudié la production possible d'agglutinines chez *Opuntia*.

TECHNIQUE

Un plant d'*Opuntia* possédant 19 cladodes a reçu 10 injections représentant un volume total de 4 cm³ d'une suspension renfermant 20 milliards de germes au cm³. Les inoculations, répétées tous les 7 jours, ont été effectuées à doses croissantes variant de 0 cm³ 1 à 0 cm³ 5. Les suspensions étaient réalisées dans l'eau physiologique avec des plastides de *B. caryocyanus* provenant de culture de 48 heures sur gélose peptone (pH = 7) et elles étaient injectées à l'aide d'une seringue à aiguille très fine. Etant donnée la quantité de liquide inoculée, l'injection déterminait une turgescence du cladode en même temps que cet organe prenait instantanément une teinte vert foncé. Aussitôt après avoir retiré l'aiguille, on déposait une goutte de collodion au point d'inoculation.

Il y a lieu de remarquer que, pendant la période de préparation, qui a duré 63 jours, la plante a émis six nouveaux cladodes et s'est développée aussi bien, sinon mieux, que les plantes témoins.

Nous avons pensé que la résorption des éléments bactériens était très lente chez les végétaux, c'est pourquoi nous n'avons procédé à la recherche des agglutinines que 30 jours après la dernière injection.

RECHERCHE DES AGGLUTININES

Le plant entier comportait 25 (19 + 6) cladodes, 7 cladodes ayant reçu des injections ont été détachés, découpés en morceaux, puis réduits au mortier en une pulpe extrêmement visqueuse, 23 grammes de cette pâte ont été additionnés de 46 cm³ d'eau physiologique. Après broyage et expression au travers d'une toile fine, le liquide visqueux obtenu a été étendu de son volume d'eau et soumis à une centrifugation prolongée. Le liquide décanté (un peu louche) a été filtré (1) sur disque de verre poreux (SCHOTT et GEN IENA).

La filtration donne un liquide incolore, légèrement opalescent, mais visqueux. La recherche des agglutinines dans ce liquide (solution M) a été

(1) La filtration élimine une fraction des substances visqueuses et de ce fait, elle peut dépouiller le liquide d'une partie de ses agglutinines, mais cette opération est indispensable. Et l'on se rend compte combien le choix de la plante en expérience est important. L'étude de la production des anticorps chez les végétaux devrait être réalisée chez une plante dont il serait facile d'obtenir un suc non visqueux, de pH variant de 5 à 8 et de tension superficielle au moins égale à 57 dynes/cm.

effectuée (1) par le procédé macroscopique avec contrôle microscopique, suivant la technique habituellement employée au Laboratoire. Le suc des végétaux ne doit pas offrir spontanément un précipité, aussi léger soit-il, durant tout le temps que dure l'expérience. La formation d'un précipité (2) peut (LASSEUR, DUPAIX, OLIVIER, 1931) entraîner les plastides bactériennes et faire croire à une agglomération par les agglutinines.

Le produit de filtration (solution M) est additionné d'eau physiologique afin d'obtenir les dilutions suivantes: $1/2$, $1/3$, $1/4$, $1/6$, $1/8$, $1/12$, $1/16$.

Parallèlement à ces essais, nous avons recherché les agglutinines normales (pseudo-anticorps) dans un plant d'*Opuntia* non inoculé. A cet effet un certain nombre de cladodes du plant témoin ont été détachés, broyés et soumis au même traitement que les cladodes inoculés.

Résultats expérimentaux.

Remarquons tout d'abord que le suc d'*Opuntia* témoin n'agglutine pas *B. caryocyanus*.

Avec la plante inoculée, l'agglutination est négative pour toutes les dilutions variant de $1/3$ à $1/16$, seule la dilution $1/2$ peut donner lieu à des interprétations différentes. Dans ce cas en effet, on note, après 3 heures de séjour à 37° C., la présence d'assez nombreux amas. Ces amas très petits sont constitués par 3, 4 ou 5 plastides au maximum; mais à côté de ces formations, on observe un nombre égal de plastides isolées. Par conséquent suivant le tempérament de l'expérimentateur on pourra dire que l'agglutination est positive ou négative. Nous voyons combien le facteur personnel peut intervenir dans des réactions aussi peu intenses.

Causes d'erreur possibles.

Nous avons pensé que l'agglutination des Bactéries par le suc des plantes pouvait être en partie sous la dépendance de la concentration du milieu en ions H^{+} . BEAUVERIE (1929), il est vrai, a montré que la modification expérimentale du pH de l'extrait par addition d'acide chlorhydrique ou de potasse « est restée sans effet (le pH allant de 1,8 à 9,8) » dans les expériences qu'il rapporte.

Ces dernières conclusions ne cadrant pas avec celles que nous avons ob-

(1) CARBONE et ARNAUDI (1930) ayant attiré l'attention sur l'altération rapide des suc végétaux avec le temps, nous tenons à faire remarquer que toutes ces opérations ont été faites dans la même journée.

(2) Précipité dû à des substances autres que les anticorps.

servées dans l'agglutination acide des Bactéries, nous avons déterminé le pH de la solution M de suc d'*Opuntia* à l'aide de l'électrode à quinhydrone d'ATEN. Les valeurs trouvées varient entre $\text{pH} = 6$ et $\text{pH} = 6,14$. Or, non seulement cette concentration en ions H^+ est sans action sensible sur les plastides en suspension dans l'eau distillée, mais encore elle est très favorable à l'agglutination sérique de *B. caryocyaneus*. La non-agglutination de *B. caryocyaneus* par le suc d'*Opuntia* ne peut donc pas être attribuée à une stabilisation par les ions H^+ ou OH^- .

Parmi les autres paramètres qui interviennent dans l'agglutination, il faut songer à la tension superficielle, une tension trop basse pourrait en effet, être une cause de stabilisation. Or, le tensiomètre de LECOMTE DU NOUY accuse pour la solution M une tension superficielle de 57,3, 57,4 dynes/cm., à la température de 25°C . Ces valeurs sont donc pratiquement identiques à celles que fournit le sérum sanguin. Malgré sa tension relativement peu élevée, le sérum d'animaux préparés jouit de propriétés agglutinantes très développées. Il est à remarquer que le sérum est généralement employé à des dilutions supérieures au 1/10 et que pour les zones de faible dilution, l'agglutination peut faire défaut (phénomène paradoxal). Dans nos expériences sur *Opuntia* nous restons dans la zone des fortes concentrations, nous pourrions avoir un empêchement dû à un trop grand abaissement de la tension superficielle. On peut objecter que si ce fait était exact, l'agglutination se produirait aux fortes dilutions, ce qui n'est pas. Un abaissement de la tension superficielle pourrait donc, dans les conditions d'expérience, s'opposer à l'agglomération des plastides de *B. caryocyaneus* par le suc d'*Opuntia*, même si ce liquide renfermait des agglutinines.

Examinons maintenant un autre facteur d'action: la viscosité. La solution M étant, comme nous l'avons vu, très visqueuse, il n'est pas impossible qu'une telle suspension puisse stabiliser une suspension bactérienne.

Enfin, nous avons opéré sur la totalité des cladodes inoculés, nous pensions en effet, que les germes avaient dû diffuser dans la plus grande partie des organes étant donnée la quantité de liquide injectée. Or, CARBONE et ARNAUDI (1930) admettent que les agglutinines sont localisées aux tissus infectés. Ce fait implique une technique nouvelle permettant de suivre au microscope l'agglutination dans des coupes très minces de tissu infecté. Il est à peine besoin de souligner le nombre de causes d'erreur que comporteraient de telles techniques et on ne peut concevoir la recherche des agglutinines chez les végétaux que par les procédés qui pourront fournir le suc cellulaire en quantité suffisante pour permettre la détermination de ses constantes physico-chimiques.

En résumé, l'absence d'agglutination en présence de suc d'*Opuntia* ne démontre pas l'incapacité de cette plante à produire des anticorps, car l'agglomération caractéristique des plastides peut faire défaut par suite de stabilisation due à des causes diverses.

BIBLIOGRAPHIE

- ARNAUDI (C.). — *Conferenza tenuta alla Soc. Agraria di Lombardia*, Milano, 8 pages, 1932.
- BEAUVERIE (J.). — *C. R. Acad. Sc.*, vol. 133, p. 107, 1901; *Revue de Botan. appliquée et d'agricult. tropicale*, vol. IX, n° 93-94, 12 pages, 1929.
- BERNARD (N.). — *Bull. Inst. Past.*, T. 7, p. 369, 1909; *Agric. Journ. India*, 1918. — *L'évolution des Plantes*, notes publiées par Mme Bernard, Alcan, Paris, 1918; *Principes de Biologie végétale*, notes publiées par Mme Bernard, Alcan, Paris, 1932.
- CARBONE (D.). — *Boll. Ist. Sier. Milan.*, II, n° 5, p. 261, 1922.
- CARBONE (D.) et ARNAUDI (C.). — *Atti Soc. It. Sc. nat.*, vol. 63, p. 269, 1924; *Monographia dell' Ist. sierot. Milanese*, A VIII, Milano, 1930.
- KORINECK (J.). — *Publications de la Faculté des Sciences*, Univ. Charles Praha, cislo 10, 1924.
- LASSEUR (Ph.), DOMBRAY (P.) et DUPAIX (A.). — *Trav. Laborat. Microbiol. Faculté Pharmacie Nancy*, fasc. IV, p. 217-221, 1931.
- MAGROU (J.). — *Ann. Inst. Past.*, vol. 32, p. 37, 1918; *Revue de Pathol. végét.*, Vol. XI, p. 189, 1924.
- NOBÉCOURT (P.). — *C. R. Acad. Sc.*, T. 177, p. 1055, 1923; *Thèse doctorat Sciences nat.*, Lyon, 1927, 2^e édit., 1928.
- PICADO. — *Ann. Inst. Past.*, 1921.
- PICK. — *Hofmeister Beiträge*, T. I, p. 902, 1902.
- SARDINA (R.). — *Angewandte Botanik*, vol. VIII, p. 289, 1926.
- VIGLIANO. — *Boll. Ist. Sierot. Milanese*, 1922.
- WARD (M.). — *Cambridge Phil. Soc. Proc.* II, 1902.

SENSIBILISATION — FIXATION DE L'ALEXINE

M. le Professeur LASSEUR ayant consacré pendant de longues années une partie de son extraordinaire activité à l'étude du mécanisme de la fixation de l'alexine (réaction de BORDET-GENGOU), je me suis empressée d'appliquer les notions mises en évidence par mon Maître, à l'étude de la fixation de l'alexine par *B. caryocyanus*.

Je ne rappellerai donc pas la technique utilisée, puisqu'elle a été décrite

dans différents mémoires publiés par LASSEUR ou par LASSEUR et ses Collaborateurs. Je me bornerai à indiquer les conditions d'expériences :

1° pour établir un parallélisme entre le pouvoir sensibilisant et le pouvoir agglutinant des sérums-*B. caryocyaneus*.

2° pour classer l'antigène-*B. caryocyaneus* d'après son avidité pour l'anticorps.

3° pour déceler des « *parentés humores* » par la fixation de l'alexine.

Je vais rapidement examiner ces différents points, en définissant tout d'abord les conditions d'expériences.

CONDITIONS D'EXPERIENCES

L'antigène utilisé est une suspension de *B. caryocyaneus* effectuée dans les conditions suivantes :

Une culture de 40 heures sur gélose peptone de pH = 7 est mise en suspension dans l'eau physiologique. Après 3 lavages, les corps microbiens sont agités dans des ballons à billes de verre, puis soumis à une centrifugation fractionnée, on obtient ainsi une suspension parfaitement homogène. Cette suspension est amenée à une concentration de 8 milliards de germes au cm³, elle est distribuée dans des ampoules stériles. Les ampoules sont scellées puis chauffées pendant 40 minutes à 56° C. Cette température est suffisante pour amener la mort des plastides, sans déterminer toutefois des modifications importantes des plastides bactériennes et par suite une altération sensible du pouvoir antigène. Il est préférable d'utiliser des corps bactériens morts parce que, dans ces conditions, les hématies ne prennent pas la teinte violacée que l'on observe dans les systèmes renfermant des Bactéries avides d'oxygène. De plus, il est possible de préparer à l'avance une certaine quantité d'antigène ce qui permet de consacrer un temps suffisant à l'étude de la fixation de l'alexine en présence et en l'absence (pouvoir anticomplémentaire) de sensibilisatrice.

Les recherches ont été effectuées avec du sérum dilué au 1/10 et au 1/20. Les temps de contact ont été de 1 h. 1/2 à la température du Laboratoire et 1 h. 1/2 à la température de 37° C. Après ces trois heures de contact les globules rouges sensibilisés ont été ajoutés aux systèmes sensibilisants. Le mélange a été porté à la température de 37° C. La lecture des résultats a été effectuée après un séjour de 30 minutes à l'étau.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

I. — RELATION ENTRE LE POUVOIR SENSIBILISANT ET LE POUVOIR AGGLUTINANT DU SÉRUM-*B. caryocyaneus*.

Dans cette série d'expériences (1), 0 cm³ 3 d'antigène dilué au 1/2 + 0 cm³ 2 de *sérum-B. caryocyaneus* dilué au 1/20, fixent 6 unités d'alexine, c'est-à-dire 6 fois la dose minimum hémolytique soit en rapportant au cm³, 30 unités hémolytiques. Les expériences faites avec d'autres dilutions de *sérum* conduisent à des nombres concordant avec ceux que je viens d'indiquer.

Si l'on veut bien se rappeler que le *sérum-B. caryocyaneus* agglutine l'antigène homologue au 1/100.000, on est étonné de la disproportion qui existe entre le pouvoir agglutinant et le pouvoir sensibilisant du *sérum-B. caryocyaneus*.

On sait que NICOLLE était tenté d'identifier les agglutinines, précipitines avec les sensibilisatrices. La même idée a été reprise par LASSEUR dans ses différentes publications.

Les faits observés avec *B. caryocyaneus* ne paraissent pas plaider en faveur de l'unité d'anticorps. S'agit-il d'une anomalie ? C'est un point sur lequel il est bien difficile de se prononcer. Il est vrai que dans beaucoup de circonstances, les agents de stabilisation diminuent d'une façon singulière la sensibilité de la réaction de CHARRIN et ROGER. Or, *B. caryocyaneus* est un germe hautement agglutinable et sa sensibilité à l'action précipitante du *sérum* explique peut-être la disproportion qui existe entre la dilution limite d'agglutination et la quantité d'alexine fixée.

Quelle que soit l'hypothèse admise, la fixation de l'alexine et l'agglomération des plastides sous l'influence du *sérum* homologue, ne rendent objectif qu'un même phénomène, la fixation de l'anticorps sur l'antigène.

ARRHENIUS et MADSEN (1902-1904) d'une part, LASSEUR (1921), d'autre part, ont montré que les réactions anticorps sont des réactions limitées, au moins à partir d'une certaine concentration.

Si nous désignons par C₁ la quantité d'alexine fixée, C₂ la quantité d'alexine libre, K et B étant des facteurs constants, on obtient l'équation em-

(1) Dans les différents essais, j'ai utilisé l'alexine C, C/2, C/4. Sous le nom d'alexine C j'entends désigner la concentration pour laquelle 0 cm³ 1 d'alexine C suffit à hémolyser l'unité de globules rouges sensibilisés (1 cm³) dans l'unité de temps (30') sous le volume de 3 cm³.

pirique suivante, proposée par LASSEUR, P. VUILLEMIN, HUBLER et LA-VILLE :

$$C_1 = K C_2^n + B \quad (1)$$

II. — AVIDITÉ DE L'ANTIGÈNE-*B. caryocyaneus* POUR L'ANTICORPS
B. caryocyaneus.

Lorsqu'on sensibilise un grand nombre de Bactéries par leur sérum homologue, on constate que toutes ces Bactéries ne se comportent pas de la même façon dans la fixation de l'alexine.

Avec certains Bacilles (ex. : *B. chlororaphis*, *B. balticus*), la quantité d'alexine libre est extrêmement faible, souvent non décelable par les techniques sérologiques usuelles. Dans d'autres cas, au contraire, la quantité d'alexine libre acquiert une assez grande valeur (ex. : *B. Le Monnier*, *B. pyocyaneus*). Ces particularités des deux groupes de complexes anticorps-antigène se traduisent à l'échelle sérologique de la façon suivante :

Imaginons une expérience dans laquelle on ajoute des quantités croissantes d'alexine (0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 d'alexine C) à des quantités constantes de complexe fixateur (antigène + anticorps homologue). Avec *B. balticus*, *B. chlororaphis*, le tube à hémolyse nulle sera immédiatement suivi d'un tube à hémolyse totale si la quantité d'alexine mise en expérience a augmenté d'une unité hémolytique d'un tube à l'autre. Par contre, pour *B. Le Monnier*, *B. pyocyaneus* on observe un tube à hémolyse nulle suivi de un ou plusieurs tubes à hémolyse partielle, l'hémolyse croissant à mesure qu'augmente la quantité d'alexine mise initialement en œuvre pour arriver finalement au tube à hémolyse totale.

L'expérience montre que le complexe fixateur *anticorps-antigène-B. caryocyaneus* doit être rangé dans la catégorie des complexes offrant une grande avidité pour l'alexine. Avec ces systèmes, il n'y a pas lieu de craindre une réversibilité possible lorsque l'on fait varier la concentration par addition de globules rouges, aussi les essais effectués à des dates différentes donnent-ils des résultats remarquablement constants.

« PARENTES HUMORALES »

L'agglutination a décelé l'existence d'une « parenté humorale » entre *B. caryocyaneus* et *B. chlororaphis*. Et à ce moment on pouvait supposer que la réaction de BORDET-GENGOU confirmerait les faits observés dans la réaction de CHARRIN et ROGER. Le faible pouvoir sensibilisant du sé-

(1) Dans certains cas, la valeur de n est égale à 1.

rum-*B. caryocyaneus* pour l'antigène homologue ne laissait guère espérer une telle éventualité. Nous avons vu que le sérum (capable d'agglutiner à la dilution du 1/100.000) ne fixe à la dilution du 1/20 qu'un petit nombre d'unités hémolytiques. Par suite pour mettre en évidence le pouvoir sensibilisant pour un antigène hétérologue, il aurait fallu employer le sérum à une forte concentration; or dans ce cas, nous nous serions heurtés à la fixation de l'alexine par l'anticorps (pouvoir anticomplémentaire des sérums). Aussi nous sommes-nous contentés d'opérer avec des sérums dilués au 1/10. Dans ces essais, répétés plusieurs fois, *B. chlororaphis* n'est pas sensibilisé par le sérum-*B. caryocyaneus*, en d'autres termes, il n'y a pas d'alexine fixée par *B. chlororaphis* lorsque cette Bactérie est additionnée de sensibilisatrice-*B. caryocyaneus*.

BIBLIOGRAPHIE

- BORDET (J.) et GENGOU (O.). — *Ann. Inst. Past.*, T. 15, p. 289, 1901.
CANTACUZENE. — *Ann. Inst. Past.*, T. 22, p. 54, 1908.
DOMBRAY (P.). — *Thèse médecine*, Nancy, 1927.
EPSTEIN (E.) et PAUL (F.). — *Deut. med. Wochenschr.*, n° 3, Bd. 48, p. 89, 1922.
KRAUSS. — *Wien. klin. Wochenschr.*, n° 31, p. 736, 1897.
LASSEUR (Ph.). — *Soc. Sciences*, Nancy, février 1921.
LASSEUR (Ph.) et SPILLMANN (L.). — *Réactions anticorps*, fasc. I, 215 pages, Imprimeries Réunies, 1921.
LASSEUR (Ph.) et MARTIN (R.). — *Trav. Laborat. Microbiol.*, Faculté Pharmacie, Nancy, fasc. II, p. 61-80, 1929.
LÉVY (R.). — *Thèse Pharmacie*, Nancy, 173 p., 1928.
MARTIN (Roger). — *Thèse Pharmacie*, Nancy, 115 pages, 1930.
WASSERMANN. — *Zeitschr. f. Hyg.*, Bd. 42, p. 267-292, 1903.
WIDAL et ABRAMI. — *Bull. Soc. méd. hop.*, p. 947, 1908.
WINKLER. — *Berlin. tierärztl. Wochenschr.*, Bd. 27, p. 933, 1911.
-

CHAPITRE VI

VARIATION

Généralités.

Dans les pages précédentes, je me suis efforcée de donner un tableau aussi complet que possible de la vie de *B. caryocyaneus* dans les différents milieux de culture et dans l'organisme animal ou végétal.

En se rappelant que, comme toutes les sciences, la Microbiologie fait appel aux notions primordiales de nombre, de temps, d'espace..., on peut envisager le problème d'une façon un peu différente.

Il peut être intéressant de rapprocher la vitesse de croissance d'un élément de *B. caryocyaneus* de la vitesse de croissance des végétaux. « *Trop lent ou trop rapide, le mouvement nous échappe.* » On ne peut suivre le déroulement simultané « *de phénomènes ayant le détail que comporte l'éclatement d'un obus* » (J. PERRIN, 1930) ou le déplacement en hauteur du sommet d'un Olivier ou d'un Oranger. On a une idée de la valeur de ce déplacement en se souvenant que le tronc de l'Olivier « *s'épaissit de quelques millièmes de millimètre par an* ». (PLANTEFOL, 1931). Par contre dans sa période de grande croissance un Bambou géant s'allonge de 30 cm. en 24 heures et le déplacement du sommet de sa tige est un mouvement perceptible à l'œil (PLANTEFOL, 1931).

J'ai décrit l'ensemble des processus vitaux pour des temps de l'ordre de jours, mais l'aspect de la question varie si l'on fait intervenir la durée de génération d'une Bactérie. De même lorsque j'attribue à *B. caryocyaneus* la faculté de colorer les milieux de culture en bleu, je conclus du général au particulier; en effet, c'est l'ensemble de la population qui donne cet aspect à la culture. Il n'est pas démontré que tous les éléments de la population bactérienne considérée jouissent de cette particularité.

Je préciserai ma pensée par un image qui me paraît très suggestive.

Prenons 3 tubes A, B, C, dans lesquels on dépose 3 poudres de couleur différente, la 1^{re} est composée exclusivement de grains blancs, le 2^e de grains noirs et la 3^e de grains gris. Dans un tube D, on place un volume V de poudre blanche, puis un égal volume de poudre noire, en évitant le mélange des deux poudres, on obtient ainsi deux zones superposées l'une blanche, l'autre noire. Dans un 5^e tube E, on dépose successivement un vo-

lume de poudre noire et un volume de poudre blanche, après agitation, le tube E, examiné à une « *distance convenable* », est gris. A cette distance, la poudre contenue dans le tube E paraît identique à la poudre contenue dans le tube C. La poudre du tube E demeure grise, même si on prolonge longtemps l'expérience. Si on examine les poudres des tubes E et C à l'aide d'une loupe, on constate alors que la poudre du tube C est constituée de grains gris et exclusivement de grains gris, tandis que la poudre du tube E est formée de grains noirs et de grains blancs groupés d'une façon déterminée (1). Suivant l'échelle d'observation, le système E paraîtra homogène ou hétérogène.

De même, on conçoit que la population bactérienne d'une culture de *B. caryocyaneus* puisse être constituée par des éléments qui ne sont pas identiques. Suivant la nature, le nombre et le mode d'association des « *variants* » (2), on obtiendra des cultures d'aspect plus ou moins différent (3).

Il est une autre notion que les microbiologistes ne font pas souvent intervenir, c'est celle de l'espace. Suivant que les germes pourront se répartir dans un volume V ou $x \times V$ de liquide, il est évident que ces germes se trouveront dans des conditions de vie très différentes, tant au point de vue de l'épuisement des éléments nutritifs qu'à celui de l'accumulation des produits toxiques de sécrétion.

Je suis ainsi conduite à envisager maintenant les arguments invoqués par les biologistes en faveur de l'étude de la variation chez les Bactéries.

Historique (4).

Les modifications temporaires ou permanentes des microbes ont suscité un nombre considérable de recherches. Il y eut, comme dans tous les problèmes scientifiques, des périodes d'engouement et d'indifférence.

(1) Il est évident que le brassage des grains noirs et des grains blancs peut réaliser un nombre considérable de combinaisons. GUYE (1922) a montré que l'on peut arranger 20 grains de plus de 2 milliards de milliards de façons différentes. (*L'évolution physico-chimique*, p. 39.)

(2) Sous le terme de « *variants* », je désigne les éléments se différenciant de l'élément type normal.

(3) BOREL (1914-1928), GUYE (1922) ont étudié la représentation analytique des fluctuations non seulement en biologie, mais encore en physico-chimie (GUYE), ce qui constitue pour nous un point d'une haute importance.

(4) Le lecteur trouvera de plus amples renseignements historiques tout d'abord dans l'article intitulé: « *Modifications temporaires, Modifications durables observées chez les Bactéries* », par Ph. LASSEUR, J. MARCHAL et A. DUPAIX (*Trav. du Laboratoire de Microbiologie*, fasc. III, p. 104, 1930), ensuite et surtout dans le travail remarquable de J.-G. MARCHAL: « *Variation et Mutation en Bactériologie* » (Le François, Paris, 1932).

Dès que la bactériologie fut sortie de l'ère des tâtonnements, on s'aperçut assez rapidement qu'il était presque impossible de trouver pour chaque microbe « *un petit nombre de propriétés assez nettes et assez constantes* ». (E. DUCLAUX), 1898, p. 260), pour pouvoir assurer la diagnose des formes bactériennes. L'idée d'espèce est tellement liée à l'idée de classification, « *le fait naturel est si bien confondu avec son expression artificielle* » (E. DUCLAUX) que de nombreux savants, après avoir constaté l'impossibilité d'une classification, ont conclu à la négation de l'espèce en microbiologie. On a vu alors les biologistes se ranger en deux clans, les uns croyant à l'existence de l'espèce microbienne et à la possibilité d'une classification, les autres considérant qu'une souche microbienne peut subir de telles modifications de forme et de propriétés, suivant les conditions de milieu, que le concept d'espèce doit être abandonné.

Je ne rappellerai pas les polémiques entre les partisans de ces deux écoles et je limiterai cette analyse aux travaux concernant les modifications bactériennes en général.

Il est incontestable qu'une souche bactérienne peut offrir, suivant les conditions de milieu, des modifications assez grandes de ses propriétés morphologiques et biologiques. Remarquons tout de suite que des causes en apparence extrêmement petites peuvent déterminer des modifications considérables des cultures, c'est ainsi que la présence d'un dix-millième, d'un cent-millième, d'un millionième d'un métal donné peut permettre la production régulière d'un pigment ou s'opposer au contraire à la formation de corps colorés. C'est pour avoir négligé ces facteurs d'action que l'on a considéré le pouvoir chromogène comme un attribut inconstant de la plasmide bactérienne.

Dès maintenant, il apparaît que la culture des Bactéries dans des conditions rigoureusement définies devient très difficile et l'on conçoit qu'un grand nombre d'auteurs ait préféré parler de *mutations*, de *variations* plutôt que de s'astreindre à une vérification sévère des conditions d'expérience.

Les transformations brusques ne sont pas nécessaires pour expliquer certains phénomènes (1). Par des passages appropriés, il est possible d'exalter ou d'atténuer les différentes fonctions d'une semence donnée.

(1) C'est ce qui découle des travaux de PASTEUR, FITZ, PERDRIX, GRIMBERT, DUCLAUX, KLEIN, etc...

ARGUMENTS

QUI MILITENT EN FAVEUR DE L'ETUDE DE LA VARIABILITE CHEZ LES BACTERIES

Nous allons envisager quelques-uns des faits qui justifient l'intérêt que les chercheurs paraissent attacher à la variabilité des Bactéries.

A. COURTE DUREE D'UNE GENERATION CHEZ LES BACTERIES

Les Bactéries paraissent constituer un matériel idéal pour l'étude de la variation. Les travaux de BUCHNER, LONGARD, RIEDLIN (1887), MARSHALL WARD (1895) RÉGNIER et LAMBIN (1927), RÉGNIER et ses élèves ont montré que la durée d'une génération microbienne est de l'ordre de 20 à 40 minutes. Si on prend 30 minutes comme temps moyen de durée de génération, on arrive au nombre de 48 générations bactériennes en 24 heures et après quelques années de culture, le nombre des générations est de l'ordre de celui que l'on observe durant une époque géologique pour les êtres supérieurs.

B. NOMBRE CONSIDERABLE D'INDIVIDUS SUR LESQUELS ON OPERE

On assiste non seulement à un nombre considérable de générations, mais encore, on opère sur un nombre immense d'individus, puisqu'en 24 heures, par exemple, une cellule de Levure pourrait théoriquement donner naissance à 10.000.000 de cellules (E. DUCLAUX).

Revenons à l'exemple de *B. caryocyaneus*. Lorsqu'on suit sur gélose nutritive le développement de ce germe à partir d'une plastide unique, on constate des variations considérables dans la durée de génération. Déposons à la surface de cette gelée une série de plastides suffisamment espacées pour qu'elles ne puissent pas venir en contact les unes avec les autres. Examinons avec un grossissement convenable les différents éléments microbiens. Nous constatons que certains d'entre eux ne subissant aucune modification morphologique perceptible, meurent sans se diviser tandis que d'autres donnent naissance à des plastides-filles. La durée de cette première génération varie suivant les conditions de milieu de 45 à 120 minu-

tes, puis la vitesse de division s'accélère pour atteindre des valeurs de l'ordre de 45 à 67 minutes (1).

La longueur relative de la durée d'une génération chez *B. caryocyaneus* n'empêche pas moins l'obtention de centaines de milliards d'individus dans une culture de quelques centimètres cubes.

COMPLICATIONS DANS L'ETUDE DE LA VARIABILITE CHEZ LES BACTERIES

L'étude des modifications temporaires ou durables chez les Bactéries se heurte à de grandes difficultés.

PREMIERE CAUSE D'ERREUR

Tout d'abord le caractère attribué à une souche microbienne est le caractère moyen d'une population, c'est-à-dire la résultante des caractères individuels et non l'extrapolation des caractères d'une unité.

Lorsqu'on examine une préparation, c'est de l'impression d'ensemble fournie par la totalité des plastides que l'on déduit l'ordre de grandeur des formes observées. Pour être précis, il faut opérer sur une préparation peu riche en germes bactériens et mesurer une à une toutes les plastides de différents champs microscopiques. Si une seule plastide présente une modification même héréditaire, cette modification peut passer inaperçue, alors qu'elle serait parfaitement enregistrée si on opérait avec des êtres d'organisation élevée, facilement repérables et dont la descendance peut être aisément suivie.

DEUXIEME CAUSE D'ERREUR

Culture mixte ou culture impure

Les anciens bactériologistes savaient combien il est difficile d'obtenir une culture pure et ils ne manquaient jamais d'attirer l'attention sur ce point

(1) La vitesse de division dépend de nombreux facteurs d'action et en particulier :

- 1° De l'espèce microbienne expérimentée;
- 2° De la température de culture;
- 3° De la nature du milieu. On sait en effet que la vitesse de division est généralement plus petite sur milieu solide que sur milieu liquide. Etc...

particulier. C'est à tort que, depuis, on a cru réaliser des cultures pures à l'aide des méthodes d'isolement sur milieu solide préconisées par KOCH. Il est souvent très difficile de séparer deux germes initialement associés. Ainsi un *Coccus* associé à un *Bacille* chromogène jaune a résisté à douze isollements sur plaque de gélose. Il n'y a qu'un seul moyen d'obtenir une culture pure, c'est d'adopter des techniques permettant l'obtention d'une colonie à partir d'un germe unique.

Nous estimons avec F. CHODAT (1926) que tous les travaux relatifs à la variation n'étant pas fondés sur l'observation directe et le développement d'un germe unique, ne doivent être acceptés que sous réserves.

Il ne suffit pas, en effet, d'avoir isolé une plastide, encore faut-il la protéger contre des contaminations ultérieures possibles.

Supposons qu'une plastide de *B. caryocyaneus* soit transportée sur gélose ou gélatine nutritives. Les conditions étant favorables, l'élément bactérien va se multiplier. Au bout de dix heures, à la température du laboratoire, nous apercevrons une très jeune colonie montrant des prolongements formés de plastides placées bout à bout, conduisant à de véritables essaïms qui constituent des colonies secondaires. De la colonie initiale à la colonie secondaire, on voit le long de la route jalonnée par les plastides formant le prolongement, des éléments mobiles allant de la colonie initiale à la colonie secondaire. Plus rarement, les plastides quittent la route et alors deux cas se présentent : ou bien la plastide regagne le prolongement dont elle est partie et continue sa course vagabonde, ou bien elle s'immobilise et, par multiplication, forme une colonie secondaire.

Quinze à seize heures après l'ensemencement, les éléments bactériens sont si nombreux qu'il est difficile d'en distinguer la forme, mais l'agitation est intense et rappelle l'aspect d'une fourmilière qu'on vient de bouleverser. La motilité s'observe surtout dans les prolongements de la colonie. Ces faits expliquent pourquoi certaines espèces bactériennes donnent si facilement des voiles envahissants et on comprend aussi pourquoi des colonies, cependant assez séparées, peuvent avoir une population mixte, même en ayant pour origine une *seule plastide*.

TROISIEME CAUSE D'ERREUR

Les plastides bactériennes se trouvent constamment en contact avec les diverses substances dissoutes dans le liquide nutritif et de ce fait, elles réagissent plus violemment que les êtres protégés contre le milieu extérieur par un revêtement.

Par adsorption, la plastide peut fixer les substances les plus diverses, mais avec des intensités très variables. Il s'ensuit que l'on obtiendra autant de types de plastides que de conditions expérimentales différentes.

Peut-on considérer ces modifications comme durables? Tout dépendra de l'échelle d'observation. Ce sera non, si on fait porter l'expérience sur un grand nombre de générations (ex. : celles qui se réalisent dans une culture de vingt-quatre ou quarante-huit heures). Et ce sera oui, si on n'observe qu'une ou deux générations.

La composition chimique des Bactéries dépendant dans une certaine mesure de la composition des milieux nutritifs, il faut s'attendre à trouver une relation entre la forme des plastides et la nature des milieux de culture.

Les travaux de P. GIRARD (1929), de MINOUX (1927) ont montré comment on pouvait faire varier la tension superficielle (plus exactement la tension interfaciale) et de ce fait la forme des Bactéries.

Et la forme observée au temps t est le résultat de l'équilibre entre la plastide et le milieu.

Lorsqu'une Bactérie cesse de produire du pigment à 37° C. et cela d'une façon constante, lorsqu'une plastide s'allonge ou se raccourcit, suivant la concentration en ions H^+ , je ne dis pas que les conditions de vie ayant changé, la plastide doit s'adapter ou mourir. Je ne prête pas de psychisme à une plastide bactérienne et je dis simplement : à l'action d'un milieu défini la Bactérie répond par une réaction déterminée (1).

DISSOCIATION BACTERIENNE AU SENS DE HADLEY

Il est une autre catégorie de modifications que nous voudrions examiner rapidement avant d'exposer les résultats expérimentaux. Nous voulons parler de la dissociation microbienne, telle que la conçoivent les auteurs anglo-saxons. Il nous paraît difficile de parler de la dissociation microbienne en se fondant sur un caractère aussi contingent que l'aspect lisse ou granuleux, plat ou bombé, des colonies bactériennes.

Nous contestons formellement les caractères attribués par cette doctrine aux types S et R lorsqu'il s'agit de germes chromogènes.

Ainsi *B. chlororaphis* donne tantôt des colonies rondes, plissées, plates, sèches, tantôt des colonies rondes légèrement bombées, lisses, visqueuses. Dans la même boîte de gélose, on peut observer les deux catégories de

(1) Laisant aux naturalistes le soin de préciser la nature de cette réaction.

colonies. Or, les cultures obtenues à partir de ces deux types de colonies se comportent exactement de la même façon et, de plus, dans certaines conditions de culture, les colonies plissées peuvent donner des colonies lisses, et inversement les colonies lisses peuvent donner des colonies plissées.

B. Le Monnier offre lui aussi deux types de colonies, les unes petites, de coloration jaune-verdâtre ou verte, les autres grandes, de coloration bleu de Prusse. Or, le dimorphisme des colonies pour *B. Le Monnier*, comme pour *B. chlororaphis*, doit être attribué non pas à une « *variation* » des plastides bactériennes, mais à la variation de certains facteurs physico-chimiques régissant le système colloïdal où se développent les Bactéries. La nature de la gélatine (1) mise en œuvre, sa concentration dans la gelée, la nature de la peptone, la concentration du milieu en éléments nutritifs, la réaction du milieu, la température de culture, l'épaisseur de la couche de gélatine, la viscosité du milieu, sa teneur en eau, etc..., sont autant de causes agissantes pour déterminer la prédominance de l'un ou de l'autre type de colonie, que l'on peut ainsi produire à volonté.

Nous sommes convaincus de l'existence de modifications durables chez les Bactéries; elles peuvent même apparaître sans causes apparentes. La multiplicité des espèces bactériennes en est la meilleure preuve, mais nous estimons que l'on a trop abusé du mot de *mutation* en Microbiologie, et la liste des exemples de « *variation, mutation* » se raccourcirait singulièrement si on procédait à un contrôle rigoureux de tous les faits décrits. La vérification étant effectuée, il resterait la question d'interprétation qui, évidemment, varierait avec le tempérament de chaque individu.

D'ailleurs pour M. le Professeur CUÉNOT « *la mutation est exactement un changement dans un facteur germinal et par extension... la variation héréditaire visible, forte ou faible, qui est la conséquence de ce changement* » (La genèse des espèces animales, 1921, p. 223).

C'est pourquoi, nous estimons avec RIPPEL (1929) que le mot *mutation* ne peut guère être utilisé en Bactériologie, à moins de le prendre dans un sens différent de celui que lui attribuent les génétistes.

OBTENTION DE CULTURES A PARTIR D'UNE SEULE PLASTIDE BACTERIENNE

L'importance de l'obtention de cultures issues d'une seule plastide n'a pas échappé à tous les bactériologistes, aussi de nombreux chercheurs se

(1) Nous entendons par là le produit commercial vendu sous le nom de gélatine en feuilles.

sont-ils efforcés de réaliser ces conditions d'expérience et les méthodes préconisées dans ce but sont très nombreuses. A ce sujet je citerai les techniques proposées par SCHMIDT (1896), CHABRY (1887), SCHOUTEN (1905), Mac CLENDON (1907), BURRY (1909), TCHAHOTINE (1912-1921), BARBER (1914), CHAMBERS (1913), MALONE (1918), ZEISS (1922). A toutes ces méthodes on peut reprocher la contamination possible, de la plastide que l'on vient d'isoler, lors de son transport dans un milieu nutritif (1).

D'autres auteurs (HORT, 1920; ORSKOW, 1922) ont compris l'intérêt qu'il y avait à laisser la plastide se développer à la place où on l'avait repérée. Malheureusement les auteurs n'ont pas cru, dans leur technique, devoir se mettre à l'abri des contaminations pouvant provenir de l'air.

MODE OPERATOIRE UTILISE DANS NOS RECHERCHES

Après de nombreux passages et des isolement répétés, il nous a été donné d'observer, chez *B. caryocyanus*, deux types dont l'un ne secrète plus que du pigment fluorescent vert (race F) et dont l'autre a perdu tout pouvoir chromogène. Mon camarade MARCHAL a isolé un certain nombre de plastides à l'aide de la cellule que nous avons décrite antérieurement M. le Professeur LASSEUR, G. MARCHAL et moi (1930-1931).

Bien qu'ayant à notre disposition un micro-manipulateur de ZEISS, nous avons préféré avoir recours, pour des raisons de sécurité expérimentale, à une méthode dérivée de celles de HORT et de ORSKOW. Le dispositif employé actuellement au Laboratoire de Microbiologie peut être considéré comme une cellule de Van TIEGHEM-LE MONNIER, munie d'une armature métallique rigoureusement fermée et portant sur le côté un tube pour l'ensemencement de la gélose ou le prélèvement des colonies.

Les figures 9 et 10 représentant les différentes parties de la cellule et l'aspect de la cellule montée, nous dispensent de plus longs détails.

Après avoir coulé la gélose dans la petite cuve, délimitée par l'anneau de verre B₁ et sa lamelle, l'appareil est stérilisé à 110° C. pendant 30 minutes. L'ensemencement s'effectue par le tube T.

On trempe dans une culture de 12 à 16 heures effectuée en milieu liquide,

(1) On peut objecter que cette contamination peut se produire aussi lors des ensemencements effectués avec une quantité importante de matériel microbien; mais il n'est pas besoin d'insister pour que l'on comprenne la différence fondamentale qui existe entre l'importance de la contamination dans les deux cas.

un stylet de verre à pointe très fine, et touche avec celui-ci, sans le recharger, la surface de la gélose successivement au centre de chacun des petits carrés délimités sur le fond de la cellule. On opère ainsi avec des séries de dilutions.

Tous les essais doivent être effectués dans une atmosphère calme (le matin avant tout nettoyage), où seuls travaillent l'opérateur et un aide éventuel.

On examine avec un objectif faible (apochromatique LEITZ, n °20), la source lumineuse (1) employée est homogène et intense. Les plastides bactériennes sont visibles à la surface du milieu gélosé sans qu'on ait recours à une tache de contraste (2). Les carrés ne contenant qu'une Bactérie sont numérotés. On suit au microscope le développement de la plastide choisie. Au bout de vingt, vingt-quatre, quarante-huit heures, on procède à l'ensemencement. Très souvent, on transporte la colonie entière ou presque entière dans le milieu nutritif. Cette opération doit évidemment être effectuée avec le plus grand soin.

MODIFICATIONS ANTERIEUREMENT DECRITES CHEZ LES BACTERIES FLUORESCENTES

Avant de décrire les modifications qu'il nous a été donné d'observer chez *B. caryocyaneus*, nous rappellerons quelques exemples de « *variation* » signalés chez les Bactéries fluorescentes.

BOUCHARD, sur des Bacilles fluorescents de l'intestin, WASSERZUG (1887), CHARRIN et ROGER, CHARRIN et PHISALIX (1892), CHARRIN et DISSARD (1893), D'ARSONVAL et CHARRIN (1893), BLAISE et SAMBUC (1897), GESSARD (1891-92-1901-02-17-19-20-22-25) sur *B. pyocyaneus* ont réussi à suspendre temporairement ou à abolir définitivement la fonction chromogène.

L. STETTENHEIMER (1913) aurait observé la transformation de *B. punctatum* en *B. fluorescens*, lequel se serait transformé à son tour en *B. pyocyaneus* (3).

(1) Lampe à projection de 6 volts, 5 ampères.

(2) Encre de Chine par exemple.

(3) En 1914, Ph. EISENBERG décrit une série de formes issues par « *mutation* » du groupe des Bactéries fluorescentes. Ces diverses formes bactériennes se distingueraient les unes des autres par l'aspect des colonies, la fonction pyocyanogène, la fonction fluorescigène, le pouvoir gélatinolytique.

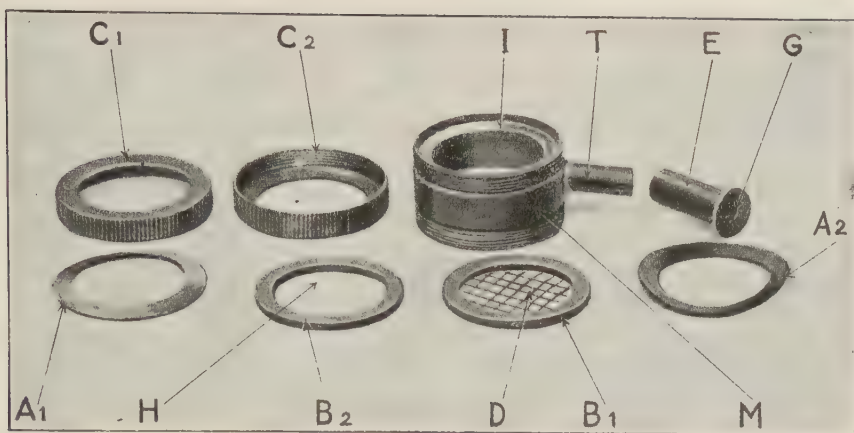


Fig. 9. — Cellule démontée

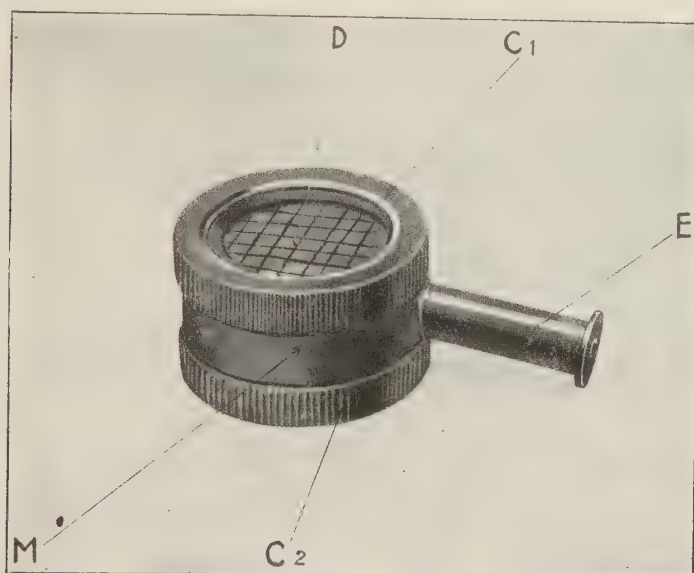


Fig. 10. — Cellule ensemencée

LÉGENDE DES FIGURES

- A = anneau de caoutchouc.
- C₁ et C₂ = anneau de verre, supportant les lamelles D et H.
- B₁ et B₂ = anneaux métalliques vissés servant de fermeture.
- D = lamelle de verre ronde (24 millimètres de diamètre).
- E = capuchon assurant la fermeture du tube ménagé pour l'ensemencement*
- G = petite ouverture du capuchon.
- H = disque de verre assurant la fermeture de l'appareil.
- I = gorge supérieure.
- J = gorge inférieure.
- M = armature métallique.
- T = tube latéral d'ensemencement.

Bien que les conclusions de STETTENHEIMER se trouvent en concordance avec les résultats obtenus par RUZICKA (1889), et malgré le témoignage de haute probité scientifique que lui décerne le professeur LEHMANN dans sa « *Nachwort* », on est obligé de faire des réserves sur les conclusions de l'ingénieux microbiologiste.

B. chlororaphis, germe voisin de *B. pyocyaneus*, nous offre un exemple de modification durable du pouvoir chromogène (LA SEUR, 1911; LASSEUR et MERCIER, 1911). Ce germe ne paraît pas pousser à 37° C., mais si l'examen porte sur des centaines de tubesensemencés, on constate que 1 à 7 % de tubes montrent un développement à cette température avec toutes les caractéristiques de l'espèce. Or, il est possible d'obtenir non pas 1 à 7 % mais 64 et 88 % de cultures se développant normalement à 37° C. (cristaux verts) en effectuant un passage par l'organisme de la Souris.

On ne peut pas étudier longuement *B. pyocyaneus* sans envisager les germes voisins, et c'est ce que fit GESSARD lorsqu'il découvrit trois races de *B. cyanogenes*:

1° Une race ne produisant que le pigment gris-bleu, obtenue comme la race P. de *B. pyocyaneus* par passage sur albumine;

2° Une race ne produisant que de la fluorescence, obtenue en réensemencant une vieille culture en bouillon ou en gélatine.

3° Une race incolore, obtenue par vieillissement prolongé des cultures précédentes ou par leur chauffage à un degré immédiatement voisin de la température qui amène la mort du microbe.

MODIFICATION NOUVELLE PRESENTEE PAR *B. CARYOCYANEUS* BEIJERINK-DUPAIX RACE FLUORESCENTE VERTE

Lorsqu'onensemence *B. caryocyaneus* sur milieu synthétique L₁, on observe tout d'abord la production d'un pigment fluorescent vert mais plus tard apparaissent les substances colorées bleue, violette et noire caractéristique de l'espèce (Voir pl. I, fig. 2, 3, 4, p. 103).¹

J'ai essayé de créer une race dégradée exclusivement fluorescente (pl. I, fig. I, p. 103) en réensemencant (1) la culture dès l'apparition du pigment vert fluorescent. C'est ce qui ressort de l'examen du tableau suivant :

(1) En moyenne toutes les vingt-quatre à quarante-huit heures.

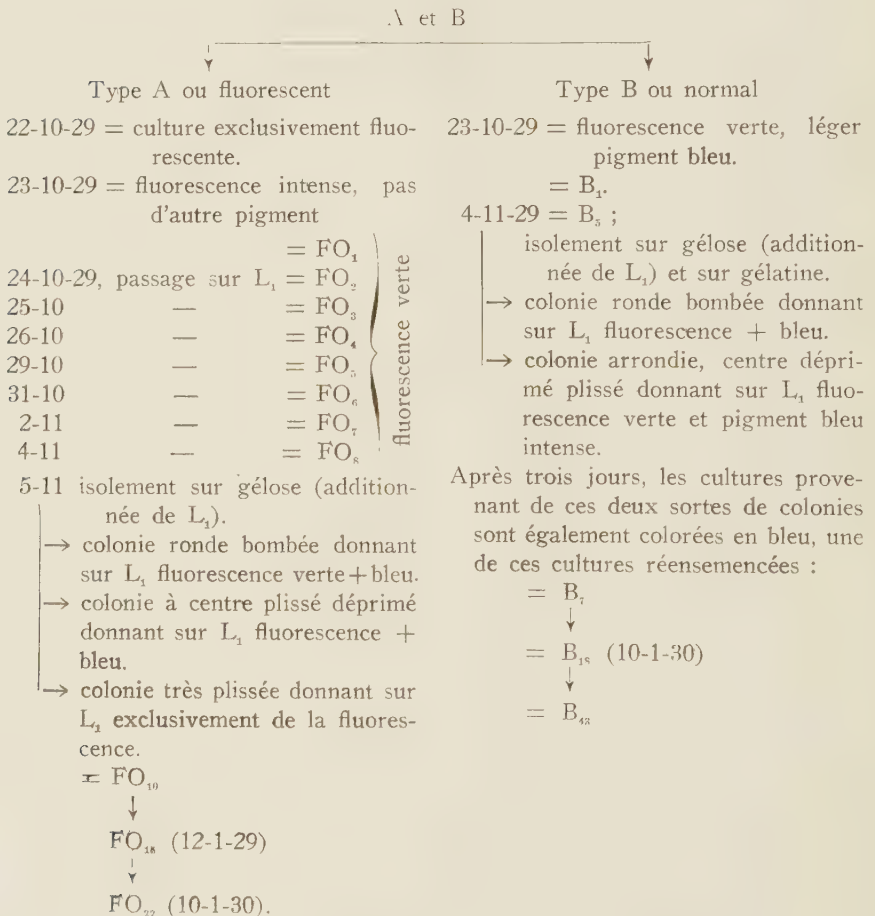
TABLEAU XLVI

OBTENTION DE LA SOUCHE FO₂₂

Isolement sur plaque de gélose et passages hâtifs
sur milieu synthétique L₁.

Culture adressée par la National Collection de LONDRES,
le 16-10-29, cultureensemencée sur milieu L₁.
19-10-29, deuxième passage sur milieu L₁,
20-10-29, isolement sur plaque de gélose.
21-10-29, les colonies sontensemencées sur milieu L₁.

Ces colonies donnent deux catégories de cultures :



Remarque. — Les chiffres ou les nombres en indice indiquent le nombre de passages sur milieu L₁.

Après huit passages, j'ai ensemencé la culture FO_8 sur plaque de gélose additionnée de liquide L_1 , dans ces conditions, j'ai obtenu trois catégories de colonies.

- 1° Colonies rondes bombées ;
- 2° Colonies arrondies à centre déprimé plissé ;
- 3° Colonies très plissées.

Les colonies très plissées ensemencées sur liquide L_1 donnent des cultures uniquement fluorescentes. Après vingt-deux passages (souche FO_{22}) sur milieu L_1 , il a été procédé à l'isolement de plastides bactériennes suivant la technique indiquée. Nous avons ainsi obtenu quatre cultures ayant chacune pour origine une seule plastide. Puis nous avons réensemencé sur milieu L_1 la souche la plus fluorescente FU_1 , et après un deuxième passage sur milieu L_1 , il a été de nouveau procédé à l'isolement de plastides. Nous avons obtenu six souches fluorescentes FU_2A , FU_2B , FU_2C , etc, ayant certainement pour origine une seule plastide. La souche FU_2D a présenté le maximum de fluorescence ; elle a été le point de départ d'une série de passages sur milieu nutritif L_1 en sélectionnant toujours les cultures les plus fluorescentes.

Nous avons schématisé dans le tableau suivant l'obtention de la race fluorescente FU_{18} à partir de la souche FO_{22} .

TABLEAU

TABLEAU XLVII

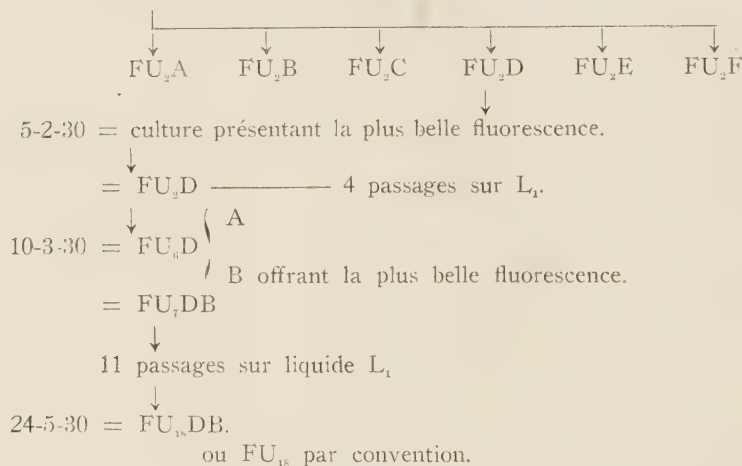
OBTENTION DE CULTURE A PARTIR
D'UNE SEULE PLASTIDE

Isolement effectué sur la souche FO₂₂.

13-1-30 = isolement de plastides; après développement de ces plastides isolées en colonies, ensemencement sur milieu L₁ (4 souches). Souche la plus fluorescente = FU₁.

24-1-30 = FU₁ = deuxième passage sur L₁.

29-1-30 = isolement de six plastides.



Remarque. — Les chiffres ou nombres en indices indiquent le nombre de passages sur milieu synthétique.

Pour faciliter l'exposé, nous désignerons la souche FU₁₈ sous le nom de race ou type F (pl. I, fig. 1) et la souche B₄₈ (pl. I, fig. 2, 3, 4) sous le nom de race ou type B ou normal.

Ainsi qu'il fallait s'y attendre, ces souches offrent des variations dans le pouvoir chromogène, mais elles ne présentent pas de différences essentielles dans l'ensemble de leurs autres caractères de culture (1), c'est pour

(1) La vitesse de décoloration dans la méthode de Gram, la colorabilité, le nombre, la position, l'aspect des fouets, la résistance à la chaleur, aux antiseptiques, la réaction aux anions, la liquéfaction de la gélatine, le pouvoir protéolytique, l'action sur les glucides, la filtrabilité sont du même ordre dans les deux cas.

cela que nous croyons devoir résumer très brièvement, dans le tableau ci-après, les caractères comparatifs du type normal et de la race F.

TABLEAU XLVIII

Aspect comparatif des cultures du type normal (B) et de la race fluorescente (F) de *B. caryocyanus* BEIJERINCK-DUPAIX cultivés sur milieu L₁.

AGE DES CULTURES	TYPE B ou type normal	RACE F
24 heures.....	voile blanc, fluorescence verte en surface.	voile blanc, fluorescence verte en surface.
48 heures.....	voile, fluorescence verte, apparition du pigment bleu.	voile, fluorescence verte.
5 jours.....	voile grisâtre bordé de noir, la fluorescence verte a disparu, pigment bleu intense, coloration violet-rouge par transparence.	voile blanchâtre, fluorescence verte.
20 jours.....	voile noir, coloration bleu-noir de toute la masse, la zone superficielle est violet-rouge par transparence, teinte brune au fond du tube.	voile légèrement jaunâtre, fin liseré brun, coloration jaune-vert, tirant sur le brun, coloration rosée au fond du tube partant du précipité de fer.

Remarque. — L'aspect des vieilles cultures de la souche F est l'aspect général des Bacilles fluorescents cultivés en milieu L₂ (action du fer sur le pigment fluorescent).

Les colonies sur gélose des types B et F n'offrent pas de différences sensibles lorsqu'on les compare après quatre, huit, dix jours de culture. Par contre, on observe des différences très nettes dans la formation des deux colonies ; c'est ce qui ressort de l'examen du tableau suivant :

TABLEAU XLIX

Tableau résumant la formation des colonies de

B. caryocyaneus BEIJERINCK-DUPAIX.

F	B
Nombreux centres d'essaimage, présentant d'abord des contours arrondis puis des prolongements très accentués. Entre les essaims, on note de nombreuses formes filamenteuses constituées par 10, 15, 20 éléments. Les filaments obtenus s'entrecroisent en tous sens. Les cloisons transversales qui séparent deux plastides dans un filament sont très nettes. On perçoit souvent un balancement d'une extrémité du filament faisant un angle avec la partie immobile. Il peut y avoir rupture du filament, la partie détachée (2 ou 3 éléments) peut ou s'accoler à la partie restée fixe ou migrer un peu plus loin et être l'origine d'un nouveau filament ou d'un nouvel essaim.	Les plastides bactériennes forment de même de nombreux essaims, assez distants. Aucun filament n'a pu être constaté dans ces colonies primitives. On remarque de très nombreux diplo-bacilles. La mobilité des plastides à la surface de la gélose est beaucoup plus grande que celle des plastides F. Les prolongements de la colonie sont moins effilés que dans le cas des germes F.

Résumé. — Diplo-bacilles très mobiles, pas de filaments.

Résumé. — Filaments nombreux, plastides moins mobiles qu'en B.

Remarque. — Gélose 3 %.

CARACTERES MORPHOLOGIQUES

Si les méthodes de coloration sont incapables de déceler des différences entre les plastides des types B et F, ces différences n'en existent pas moins. En effet, les corps microbiens de ces types bactériens ne se comportent pas de la même façon à la centrifugation.

TABLEAU L

Caractères différentiels des culots de centrifugation
des suspensions bactériennes Type B et Type F.

B

Le culot de centrifugation, de coloration à peine jaunâtre, est un peu granuleux, il se remet facilement en suspension par projections d'eau.

F

Les plastides sont réunies en un culot très visqueux jaunâtre, très difficile à remettre en suspension. Sous l'action du jet d'eau, le culot se détache entièrement du verre. Si la pipette touche le culot pendant l'aspiration, les corps microbiens passent dans la pipette, mais restent accolés sous forme d'un cordon du diamètre de l'ouverture de la pipette.

CARACTERES SEROLOGIQUES

A l'aide du sérum provenant d'animaux préparés avec le type normal B de *B. caryocyaneus*, nous avons procédé à l'agglutination comparative à différentes reprises de ce type normal B et de la race fluorescente F. Dans tous les cas, l'agglutination a offert le même aspect. La dilution limite d'agglutination est de l'ordre du cent millième (1/100.000).

Il ressort de ces expériences que les types B et F sont également agglutinables. Leur haute agglutinabilité ne peut laisser aucun doute sur leur identification. Il ne saurait donc être question de cultures mixtes.

INTERPRETATION DES FAITS

En réensemencant une culture de *B. caryocyaneus* dès l'apparition de la fluorescence verte, on obtient finalement une souche qui ne donne que du pigment fluorescent.

Ces faits sont-ils susceptibles d'une interprétation simple? Peut-être, mais à la condition de ne pas remonter trop haut dans nos explications. Il serait évidemment possible d'émettre plusieurs hypothèses, mais nous nous limiterons à l'hypothèse de METALNIKOV et à l'hypothèse physico-chimique.

1° Hypothèse de METALNIKOV.

Tout le monde connaît l'ingénieuse théorie de METALNIKOV, qui peut se résumer dans la « *mémoire du déjà fait* ». Le savant biologiste a étendu

sa doctrine à la vie cellulaire et par suite elle est applicable aux faits qui nous intéressent, et c'est ce que nous ferons en disant : dans nos conditions d'expérience, la plastide n'a pas eu l'occasion d'édifier du pigment bleu et de ce fait elle perd l'habitude de sécréter ce pigment au bout d'un certain nombre de passages (1).

Malheureusement, il nous paraît difficile, dans le cas particulier, de soumettre cette hypothèse au contrôle de l'expérience.

2° Hypothèse physico-chimique.

Lorsque *B. caryocyaneus* est ensemencé en milieu L₁, il y détermine des modifications profondes telles que l'hydrolyse de l'asparagine. Le milieu, après vingt-quatre heures de culture, est donc différent du milieu initial. De plus, une population bactérienne n'est jamais homogène, toutes les plastides ne sont pas identiques, même lorsqu'elles sont issues d'une seule plastide. Par suite, les éléments bactériens d'une population donnée peuvent avoir des exigences différentes et se développer successivement dans un milieu qui va sans cesse en se modifiant.

Les plastides qui ne sécrètent que du pigment fluorescent vert sont certainement les plus résistantes (2) et, de ce fait, doivent se développer les premières (3).

C'est à l'expérience qu'il appartient d'infirmar ou de confirmer cette seconde généralisation.

(1) « On a beaucoup médité de l'interprétation finaliste... Il y a une finalité dans le monde et même dans le monde inorganisé. Elle s'exprime par le principe de LE CHATELIER auquel obéissent la plupart des processus physiques et chimiques. » (p. 148) (PLANTEFOL, 1930.)

(2) Chez les Bactéries chromogènes produisant à la fois un pigment fluorescent et un corps coloré, c'est la fonction fluorescigène qui persiste le plus longtemps lorsque les conditions de vie deviennent défavorables. Tout se passe comme si les plastides sécrétant la substance fluorescente étaient les éléments les plus résistants de la population bactérienne.

(3) Si les filtrats de vieilles cultures sont impropres à la multiplication des Bactéries, les milieux neufs ne sont pas éminemment favorables à la vie microbienne. Lorsque l'on transporte des plastides dans un milieu neuf, même électif, on observe tout d'abord la mort de nombreux éléments transportés, puis on assiste bientôt à la multiplication des plastides survivantes. La mort des Bactéries s'accompagnant de la diffusion d'éléments phosphorés, il s'ensuit qu'une culture de quelques heures peut constituer un milieu plus propice à la végétation que le milieu neuf.

La culture des tissus n'est possible qu'à la condition d'ensemencer un certain nombre de cellules. N'y a-t-il pas là quelque chose d'analogue à ce que nous observons chez les Bactéries ?

C'est à l'expérience de décider. Si ce point était contrôlé il revivifierait l'hypothèse cellulaire que la culture des tissus a singulièrement amoindrie.

RÉSUMÉ

Quoi qu'il en soit des hypothèses, un fait reste acquis : il a été possible d'isoler, d'une culture de *B. caryocyaneus*, des éléments doués seulement de la fonction fluorescigène. Cette conclusion n'a rien qui nous surprenne, car depuis les travaux de WASSERZUG, GRIMBERT, DUCLAUX, LASSEUR, etc., on sait combien les cultures microbiennes sont peu homogènes.

RACE ACHROMOGENE DE *B. CARYOCYANEUS* BEIJERINCK-DUPAIX

De nombreuses Bactéries perdent temporairement ou définitivement la faculté de sécréter des pigments lorsqu'on les cultive à 37° ou 40° C. Sous l'action de la température de 37° C., *B. prodigiosus* donne des cultures blanches (1) (GOTSCHLICH, 1929), tel est du moins l'avis de la majorité des bactériologistes. J'ai essayé, sans grand succès, d'obtenir sous l'action de la chaleur une modification permanente de *B. prodigiosus*, mais j'ai été plus heureuse avec *B. caryocyaneus*. La température optimum de ce Bacille (cultivé en milieu synthétique L₁) est aux environs de 25° C. Dès qu'on élève la température, la végétation diminue, et à 39°-40° C. la croissance est irrégulière, c'est ainsi qu'une série de trente tubes n'a donné que deux tubes (2) qui se sont légèrement troublés. Mais, par des passages successifs sur milieu L₁ maintenu à 39°-40° C. et par sélection des tubes offrant le développement le plus intense, je suis arrivée à obtenir une souche qui se développe très abondamment à 39°-40° C. Le voile est aussi épais que celui observé à la température de 25° C., mais les cultures sont complètement incolores.

(1) Le plus souvent *B. prodigiosus* ne donne pas de pigment à 37° C. Mais si on ensemence un nombre suffisant de tubes (50 par exemple) et surtout de tubes de pommes de terre, il est bien rare que l'on n'observe pas une ou deux cultures colorées.

L'action sélective de la température est surtout nette dans l'exemple de *B. chlororaphis*. Ce germe pousse mal à la température de 37° C. Si on ne cultive que quelques tubes à 37° C., en général on n'observe pas de développement; mais si l'expérience porte sur une centaine de tubes, on constate que 1 à 7 % des tubes montrent un développement et une abondante formation de cristaux verts à cette température, faits qui furent interprétés par LASSEUR (1911) comme un exemple de filtration des formes préadaptées.

Le regretté L. MULLER, à qui la bactériologie est redevable de nombreuses découvertes, a décrit des phénomènes analogues en 1928.

(2) Avec d'autres séries, nous avons obtenu des faits analogues.

Avant d'interpréter les résultats, je vais préciser les points suivants :

LA MODIFICATION EST-ELLE DURABLE OU TEMPORAIRE ?

A la température de 39° C., *B. caryocyaneus* donne une culture incolore. S'agit-il d'une manière d'être du germe à 39° C., d'une réaction du Bacille à la température ou d'une modification durable du type bactérien ? Pour répondre à cette question, il fallait, à chaque passage à 39° C., ensemercer deux catégories de tubes : les uns étant maintenus à 39° C., les autres abandonnés à la température du laboratoire (vers 20-25° C.) comme tubes contrôles du pouvoir chromogène. Après le troisième passage, les cultures incoloresensemencées sur gélose à la température de 20-25° C. ont donné des cultures légèrement fluorescentes ; après le vingtième passage à 39° C. la culture incoloreensemencée sur gélose maintenue à 25° C. n'était plus fluorescente.

La perte du pouvoir chromogène paraît donc bien durable, mais il s'agissait peut-être d'une contamination de la culture primitive ; pour nous assurer qu'il n'en était rien, nous (1) avons réalisé des cultures à partir d'une seule plastide.

ÉTUDE COMPARATIVE DES CARACTÈRES ANTIGÈNES

Dans ces essais, nous avons limité nos expériences à l'agglutination, nous réservant dans un autre travail d'étudier en détail la fixation de l'alexine.

Dans une première série d'expériences, nous avons obtenu, à partir d'une seule plastide, une souche achromogène non agglutinable, bien que le type normal soit agglutiné par le sérum homologue au cent-millième (1/100.000). Nous n'avons pas cru devoir identifier à *B. caryocyaneus*, ce germe non agglutinable par le sérum *B. caryocyaneus*, donnant des cultures incolores quelles que soient les conditions d'expérimentation et qu'aucun caractère, sauf ses antécédents, ne permettait de rattacher à *B. caryocyaneus*.

En présence de ces faits, certains auteurs auraient volontiers parlé de « variations durables », mais ce que nous avons observé jusqu'alors dans l'histoire des Bactéries chromogènes, nous fit craindre une contamination de la culture expérimentée. Nous avons stérilisé toutes ces cultures à l'auto-

(1) LASSEUR, MARCHAL, DUPAIX, 1930.

clave à 115° C. durant trente minutes et nous avons recommencé nos expériences en multipliant les précautions. Nous sommes donc repartis d'une culture normale et nous avons effectué à nouveau les passages à 39-40° C. et les isolements à partir d'une seule plastide. Dans cette seconde série d'expériences, nous avons mesuré, tous les huit jours, le pouvoir antigène de la culture soumise à l'action de la température de 39-40° C.

J'indique ci-dessous quelques-unes des mesures effectuées :

TABIEAU LI

	DILUTION LIMITE D'AGGLUTINATION
<i>B. caryocyaneus</i> type normal.....	1/80.000 (4 heures)
<i>B. caryocyaneus</i> type achromogène cultivé à 39° C (3 passages).....	1/80.000 (4 heures)
<i>B. caryocyaneus</i> type normal.....	1/32.000 (2 heures)
<i>B. caryocyaneus</i> type achromogène cultivé à 39° C (14 passages).....	1/32.000 (2 heures)

Remarque. — Les heures indiquées entre parenthèses indiquent le temps de contact après lequel la lecture a été faite.

La précision des mesures ne permet pas de dire si les dilutions limites d'agglutination sont identiques, mais elle permet d'affirmer qu'elles sont du même ordre de grandeur.

Et cependant, l'allure de l'agglutination dans les deux cas est différente. Incontestablement, la vitesse d'agglutination est plus grande avec les germes achromogènes cultivés à 39-40° C. qu'avec les germes chromogènes du type normal (1).

Dans ces expériences, nous avons donc obtenu des souches issues d'une seule plastide donnant des cultures achromogènes à 39° C. et à 20° C. et douées cependant de propriétés antigènes voisines de celles du type normal.

En résumé, par culture à 39-40° C., il a été possible de déterminer chez *B. caryocyaneus* BEIJERINCK-DUPAIX des modifications paraissant durables ; mais il faut remarquer que, dans cet exemple, la perte du pouvoir chromogène était liée à une diminution de la vitalité de la Bactérie. Le fait est si vrai qu'au cinquantième passage à 39-40° C., la souche a cessé de se développer. Nous n'avons donc pu cultiver que 250 jours environ la race achromogène de *B. caryocyaneus*.

(1) On observe d'ailleurs le même phénomène avec la race achromogène de *B. prodigiosus*.

BIBLIOGRAPHIE

- D'ARSONVAL et CHARRIN. — *C. R. Soc. biol.*, T. 45, p. 1028, 1893.
BARBER. — *Journ. Kans. med. soc.*, T. 4, p. 487, 1904.
BEIJERINCK (M.-W.). — *Folia microbiologica*, Delft, 1 Jhrg., p. 1-97, 1912.
BERNHARDT. — *Zeitschr. f. Hyg.*, Bd. 79, p. 175, 1915.
BLAISE et SAMBUC. — *C. R. Soc. biol.*, T. 49, p. 689, 1897.
BLANC (J.). — *C. R. Soc. biol.*, T. 88, p. 52-54, 1923.
BURRI. — *Das Tuscheverfahren als ein faches mittel zur Lösung einiger schwieriger Aufgaben der Bakterioskopie*, Fischer, Jena, 41 pages, 1909.
BÉGUET (M.). — *Arch. Inst. Past. d'Algérie*, T. V, p. 25, 1927.
CHAMBERS. — *Journ. of infect. dis.*, T. 31, p. 334, 1922.
CHARRIN et PHISALIX. — *C. R. Soc. biol.*, T. 44, p. 577, 1892.
CHARRIN (A.) et DISSARD (A.). — *C. R. Soc. biol.*, T. 45, p. 183, 1893.
CHARRIN et DESGREZ. — *C. R. Soc. biol.*, T. 50, p. 209, 1898.
DARZINÉ (E.). — *C. R. Soc. biol.*, T. 99, p. 92-95, 1928.
EISENBERG. — *Ergebn. d. Immunität forchen.*, Bd. 28, p. 142, 1914.
ERNST (P.). — *Zeitschr. f. Hyg.*, Bd. 2, p. 368-385, 1887.
GESSARD (C.). — *Ann. Inst. Past.*, T. III, p. 90, 1890; T. V, p. 65-78, 1891; T. V, p. 737-757, 1891; T. VI, p. 801-823, 1892; *C. R. Soc. biol.*, T. 50, p. 1033; 1893; *Ann. Inst. Past.*, T. XV, p. 817, 1901; T. XVI, p. 313-330, 1902; *C. R. Acad. Sc.*, T. 165, p. 1071, 1917; *C. R. Soc. biol.*, T. 82, p. 795, 1919; *Ann. Inst. Past.*, T. 33, p. 241-261, 1919; *C. R. Acad. Sc.*, T. 168, p. 1066, 1919; T. 170, p. 298, 1920; T. 171, p. 414, 1920; *Ann. Inst. Past.*, T. 34, p. 88-98, 1920; *C. R. Acad. Sc.*, T. 174, p. 1301, 1922; T. 180, p. 972, 1925.
GOTSCHLICH. — *Handbuch d. pathog. Mikroorg.*, Bd. I, Lfg. 12, p. 206-249, 1927.
HADLEY (Ph.). — *Journ. of infect. dis.*, vol. 40, n° 1, 1927.
HILL. — *Jour. med. Research*, vol. 8, p. 202, 1902.
HORT. — *Journ. Hyg.*, vol. 18, p. 361, 1920.
JOHANNSEN. — *Elemente der exakten Vererbungslehre*, 2 Auf. 1913.
JOLLOS. — *Biol. Centralbl.*, Bd. 33, p. 222, 1913; *Zeitschr. f. ind. Abstammung u. Vererbungsl.*, Bd. 12, p. 14-35, 1914.
LASSEUR (Ph.), MARCHAL (J.) et DUPAIX (A.). — *Trav. Laborat. Microbiol.*, Faculté Pharmacie Nancy, fasc. III, p. 105-158, 1930; fasc. IV, p. 94-97, 1931.
LEDERHOSE. — *Centralbl. f. Bakt.*, Bd. 3, p. 581, 1888.
LEHMANN. — *Biol. Centralbl.*, Bd. 34, p. 285, 1914; *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Orig., Bd. 77, Heft. 4, p. 289, 1916.
MAC'CLENDON. — *Biol. Bull.*, vol. 12, p. 141, 1907.
MALONE. — *Journ. Pathol. and Bacteriol.*, vol. 22, p. 222, 1918.
MARCHAL (J.). — *Thèse Sciences nat.*, Nancy, 1932.
NEGRONI (P.). — *C. R. Soc. biol.*, T. CVI, p. 388, 1931.
ORSKOW. — *Journ. of Bacteriol.*, vol. VII, p. 537, 1922.
RIPPÉL (A.). — *Mediz. Klin. Wochenschr. f. praktische Artze*, n° 24, 1929.

- ROCHAIX (A.) et BANSILLON (E.). — *C. R. Soc. biol.*, T. 89, p. 538-539, 1923.
- STETTENHEIMER (L.). — *Verhandlungen der Phys. Med. Gesell. zu Würzburg*, N. F., Bd. XLII, p. 141-220, 1913.
- TOENNIESSEN. — *Med. klin., Berlin*, Bd. 9, p. 792, 1913; *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Orig., p. 391, 1913; Bd. 73, p. 241, 1914; *Biol. Centralbl.*, Bd. 35, p. 281-330, 1915.
- WALKER. — *Proc. roy. Soc.*, vol. 93, p. 54, 1922.
- WASSERZUG (E.). — *Ann. Inst. Past.*, T. I, p. 581-591, 1887; T. II, p. 154, 1888.
- WINOGRADSKY (S.). — *Ann. Inst. Past.*, T. III, p. 242-253, 1889.
- WOLLMAN (M. et Mme). — *C. R. Soc. biol.*, T. XCIII, p. 1568-1569, 1925.
-

CHAPITRE VII

NOMENCLATURE

PLACE DE *B. caryocyaneus* BEIJERINCK-DUPAIX DANS LA CLASSIFICATION

Dans ce chapitre, je désirerais, autant que mes moyens me le permettent, préciser la place de *B. caryocyaneus* dans la classification et établir ses affinités avec les germes voisins.

En ce qui concerne la première question, je ne me fais aucune illusion, c'est un sujet bien trop délicat pour un jeune biologiste. Mais grâce aux savants conseils de M. le Professeur CUÉNOT, Membre de l'Institut, et aux emprunts que je ferai aux travaux classiques de CUÉNOT et VUILLEMIN, j'espère mener à bien cette tâche, tâche assez délicate, car il est impossible de donner de l'espèce une définition qui puisse s'appliquer à tous les êtres vivants.

« En effet, chaque discipline (la Zoologie, la Botanique, la Paléontologie, la Génétique, la Bactériologie) a sa conception de l'espèce qui lui est imposée par les faits qu'elle étudie, et il est incontestable que ces définitions ne sont pas sur le même plan. Tout ce que ces définitions ont de commun se réduit à une formule extrêmement vague, telle que celle-ci, par exemple: l'espèce est une collection d'individus présentant un certain nombre de caractères constants qui permettent de les identifier, ce qui n'exclut pas leur possibilité de variation. Les individus de même espèce sont donc : 1° reconnaissables et définissables (en supposant, ce qui n'est pas toujours vrai, que l'on connaisse les limites extrêmes de leur variation), 2° ils sont séparés des espèces voisines par un caractère quelconque ». (Communication verbale de M. le Professeur CUÉNOT).

Les naturalistes tentent des essais de reconstitution historique de la différenciation des formes. Ils s'efforcent de substituer à la classification naturelle de Bernard de JUSSIEU une classification reposant sur la parenté. Les bactériologistes se contenteraient, semble-t-il, provisoirement du moins, d'un catalogue semblable à celui qui a illustré le nom de *B.* de JUSSIEU.

C'est ce qui paraît ressortir du succès remporté par la Classification du Comité des Bactériologistes américains.

Si la « *Métamorphose des plantes* » de GÆTHER (1790) est une des plus belles applications du principe de continuité si cher à DARWIN, le monde microbien laisse au contraire l'impression d'une discontinuité des formes. Cela tient évidemment à ce que l'on a réuni dans le groupe des microbes les organismes les plus divers, qui ne trouvaient pas de place dans la systématique des animaux ou des végétaux (1).

L'importance de la classification ne saurait échapper à personne, même en microbiologie, où la systématique est à peine ébauchée, bien que de nombreux systèmes aient été proposés. Cependant, il me paraît difficile d'étudier une espèce bactérienne nouvelle sans chercher à la classer dans la chaîne ininterrompue que forment les microbes.

La classification des Bactéries a tenté de nombreux savants : MULLER (1786), EHRENBURG (1831), DUJARDIN (1841), NAEGELI (1857), COHN (1875-1877-1879), WINTER (1881), BURRILL (1882) ZOPF (1880-1885), FLUGGE (1886), HUEPPE (1886), STERNBERG (1892), LEHMANN et NEUMANN (1896), FISCHER (1897), MIGULA (1897-1900), ERWIN SMITH (1905) VUILLEMIN (1913), ORLA JENSEN (1919), BUCHANAN (1915-1916-1917-1918), CASTELLANI et CHALMERS (1919), le Comité des Bactériologistes américains (1923).

Une étude critique des diverses classifications proposées sortirait des limites d'une monographie, cependant, faisant l'étude d'un germe non encore catalogué dans les classifications des bactériologistes, je suis conduite à placer cette Bactérie dans le cadre fixé par quelques-uns des savants qui se sont occupés de la question.

EHRENBURG (1830), en utilisant à la fois la forme et la nature du mouvement, crée les trois genres : *Spirochaeta* (2), *Spirillum* et *Bacterium*. Le

(1) « Le nom de Bactéries apparaît en 1786. Le Danois Otto Fritz MULLER l'applique à des organismes microscopiques constitués par un seul élément, souvent mobile, quoique rigide, en forme de bâton droit ou courbé, voire même sinueux, plus ou moins long, les plus courts bâtonnets passant à l'ovale ou à la sphère. Avant de ranger les Bactéries parmi les Animalcula infusoria, MULLER (1773) les confondait avec les vers, comme auparavant LEEUWENHOECK et LINNÉ.

EHRENBURG (1830) laisse les bactéries parmi les animalcules des infusions. En 1883, il circonscrit la famille des Vibrionia, et poussant l'analyse plus loin que MULLER, créateur du genre *Vibrio*, il définit des genres d'après la nature du mouvement; il oppose par là les *Spirillum*, vraies bactéries, aux *Spirochoeta*, où nous voyons le type des Pseudobactéries qui sont des animaux. » (P. VUILLEMIN, 1929.)

(2) Il est admis aujourd'hui que les *Spirochaeta* doivent être extraits du cadre des Schizomycètes.

genre *Bacterium* est représenté par des éléments offrant un corps rectiligne, des fouets polaires et un mouvement oscillant saccadé.

Le genre *Bacillus*, créé par COHN (1875-1877-1879), s'est vulgarisé en englobant les Bactéries immobiles et les espèces à fouets diffus ou polaires (VUILLEMIN, 1913).

C'est ainsi que LEHMANN et NEUMANN (1896) différencient les genres *Bacterium* et *Bacillus* en s'appuyant uniquement sur la présence ou l'absence de spores endogènes.

MIGULA (1900) restreint le genre *Bacterium* aux Bactéries présentant des « cellules » cylindriques dépourvues de fouets, le genre *Bacillus* renfermant toutes les espèces à « cellules » cylindriques pourvues de fouets diffus. MIGULA crée le genre *Pseudomonas* pour les espèces à « cellules courtes » cylindriques munies de fouets polaires.

Ces points de nomenclature étant posés, voyons maintenant la place de *B. caryocyaneus* dans trois classifications, celles de MIGULA (1900), de VUILLEMIN (1913), et du « Committee of the Society of american Bacteriologists ».

Dans la classification de MIGULA (1900) *B. caryocyaneus* BEIJERINCK-DUPAIX appartiendrait à l'ordre des Eubactériacées, famille des Bactériacées, il devrait être placé à côté de *B. cyaneo-fluorescens* ZANGEMEISTER 1895 (1) que MIGULA prend comme un des types de son genre *Pseudomonas* (1900).

Le genre *Pseudomonas* de MIGULA serait homogène s'il se limitait à toutes les Bactéries fluorescentes possédant de 1 à 3 fouets polaires, mais l'introduction de formes telles que *Ps. violacea* (*Bacteridium violaceum* SCHRÖTTER 1880), *Ps. caerulea* (*B. caeruleus* VOGES 1893), *Ps. indigofera* (*B. indigoferus* VOGES 1893) et de Bactéries fluorescentes péritriches comme *Ps. alba* (*B. fluorescens albus* ZIMMERMANN 1890) lui fait perdre toute son homogénéité. C'est pourquoi j'ai conservé jusqu'alors le mot de *Bacillus*.

On sait que ce dernier terme n'est pas adopté par tout le monde, et si je m'en tenais aux principes de nomenclature posés par M. le Professeur

(1) On sait que *B. cyaneo-fluorescens* ZANGEMEISTER 1895 est une forme bactérienne très voisine de *B. syncyaneus* EHRENBURG 1840. Cette dernière Bactérie a été placée dans le genre *Vibrio* par EHRENBURG (1840) et FUCHS, dans le genre *Bacillus* par SCHRÖTTER (1886) et FLUGGE (1886), et dans le genre *Pseudomonas* par MIGULA (1900). *B. cyaneo-fluorescens* se différencie surtout de *B. syncyaneus* EHRENBURG par la production d'un pigment jaune-vert fluorescent.

VUILLEMIN (1913), le germe que j'étudie devrait se nommer *Bacterium caryocyaneum*.

Dans la classification des bactériologistes américains, le genre *Pseudomonas* « emended » comprend des espèces : 1) pourvues de fouets polaires, 2) munies de fouets diffus (péritriches), 3) dépourvues d'organes moteurs donc immobiles. Il est impossible d'accepter cette nouvelle conception du genre *Pseudomonas*, car elle rapproche l'un de l'autre des germes qui n'ont que des affinités lointaines et elle sépare par contre des Bactéries dont les affinités sont incontestables.

Dans la classification américaine, le genre *Pseudomonas* (tribu des Chromobactériacées, famille des Bacillacées, ordre des Eubactériaes) ne renferme que l'espèce *Ps. cyanogena* et non l'espèce *Ps. cyaneo-fluorescens*.

A ce propos, je ferai remarquer que dans « *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* » les auteurs écrivent p. 129 (14) : « *Pseudomonas cyanogena* comb. nov. (*Bacillus cyanogenus*, see *Mildenberg*, Cent. f. Bakt., II Abt., 56, 1922, 309) ». Or, dans son mémoire, MILDENBERG étudie comparativement *B. cyanogenus* et un Bacille, qu'il a isolé de l'air produisant un pigment bleu ; mais l'auteur n'identifie pas les deux germes. Dans la classification américaine, le nom d'espèce devrait donc être suivi d'un nom d'auteur.

Sous les noms de *Ps. cyanogena* et *B. syncyaneus* (EHRENBERG), les auteurs américains décrivent deux espèces. Les caractères relatés dans ces deux descriptions (p. 129 et 288) sont sensiblement les mêmes, tout au plus, *Ps. cyanogena* et *B. syncyaneus* se différencieraient-ils par la sporulation, *Ps. cyanogena* étant asporogène et *B. syncyaneus* offrant des spores terminales. Remarquons immédiatement que dans l'état actuel de la science il est impossible de considérer comme endospores les grains que l'on observe dans les plastides de nombreuses Bactéries fluorescentes telles que *B. syncyaneus*, *B. cyaneo-fluorescens*, *B. Le Monnieri*, etc... Notons en passant que dans la classification des auteurs américains, *B. syncyaneus* précède *B. megatherium* et suit *B. fluorescens* Ford., c'est en vain que l'on recherche une affinité (1) entre *B. syncyaneus* et *B. megatherium*.

Il ne peut pas exister de classifications parfaites. Les classifications sont seulement plus ou moins commodes, plus ou moins générales. La classi-

(1) Ce rapprochement singulier de *B. syncyaneus* et *B. megatherium* ne constitue pas un cas isolé dans la classification américaine et, en se limitant aux Bactéries chromogènes, on trouve que la classification du Comité des Bactériologistes américains rapproche les unes des autres des formes dont les affinités sont des plus discutables.

fication américaine peut rendre d'indiscutables services en rappelant certaines analogies ; mais elle présente beaucoup de points faibles, pour ne pas dire de nombreuses anomalies.

Le genre *Pseudomonas* Migula « emended » des auteurs américains pourrait être conservé à la condition de le limiter aux espèces dont les éléments sont représentés par des plastides cylindriques ou ovalaires munies de fouets polaires et sécrétant un pigment bleu ou vert. Ce nouveau genre restreint aurait comme type *Ps. aeruginosa* (*Bact. aeruginosum* SCHRÖTTER 1872, *B. pyocyaneus* GESSARD 1882) et comprendrait d'autres Bactéries telles que *B. caryocyaneus* BEIJERINCK-DUPAIX 1930, *B. liquefaciens* TATAROFF 1891 ; *B. violaceus* G. et P. FRANKLAND 1889 ; *Ps. berolinensis* CLAESSEN 1890, etc...

BEIJERINCK, dans des notes inédites a donné (1) le nom de *Pseudomonas caryocyaneus* au germe qu'il a isolé, mais cette Bactérie figure à la « *National Collection of Type Cultures* » de Londres sous le nom de *B. caryocyaneus*. Or, BEIJERINCK ne paraît pas avoir décrit l'espèce. Consulté sur ce sujet par M. le Professeur KLUYVER l'éminent biologiste hollandais n'a malheureusement fourni aucun renseignement précis.

Il y a donc déjà au départ une difficulté dans l'établissement de la priorité.

Malgré ces considérations nous avons retenu le nom de *Bacillus caryocyaneus* car dans les pays de langue française ce terme est plus fréquemment employé, et nous placerons ce microorganisme dans le groupe des Bactéries chromogènes produisant un pigment fluorescent et une matière colorante bleu-violet.

Différenciation de *B. caryocyaneus* et des espèces voisines

B. caryocyaneus, sécrétant une matière colorante fluorescente verte et un pigment bleu-violet, peut être rapproché d'une part des Bactéries fluorescentes, d'autre part des Bactéries produisant un pigment bleu. En effet, certains germes tels que *B. chlororaphis* G. et S. 1894, *B. pyocyaneus* GESSARD 1882, peuvent perdre la propriété de sécréter la chlororaphine ou la pyocyanine tout en conservant la faculté de produire la matière fluorescente. De plus, certaines Bactéries chromogènes fabriquant un pigment bleu peuvent acquérir la faculté de produire la substance fluorescente, c'est bien ce

(1) Communication par lettre de M. le Professeur KLUYVER.

que l'on observe en étudiant *B. cyaneo-fluorescens* Zang. qui doit être considéré comme un *Bacillus syncyaneus* à fluorescence exaltée.

J'ai été ainsi conduite à différencier *B. caryocyaneus* BEIJERINCK-DUPAIX de *B. cyaneo-fluorescens* ZANGEMEISTER.

Pour établir cette différenciation, j'ai non seulement fait appel au travail fondamental de ZANGEMEISTER (1895), à la description de MIGULA (1900, p. 906), mais encore à des notes inédites de M. le Professeur G. THIRY et de M. le Professeur LASSEUR qui avaient étudié comparativement :

B. cyaneo-fluorescens ZANGEMEISTER 1895; *B. syncyaneus* EHRENBERG 1840;

B. Le Monnieri LASSEUR 1912;

B. chlororaphis GUIGNARD et SAUVAGEAU 1894;

B. mesentericus niger LUNT 1896;

B. caeruleus VOGES 1893.

Ensuite, j'ai cultivé, dans les mêmes conditions, *B. cyaneo-fluorescens* ZANG. provenant de la collection PRIBRAM et *B. caryocyaneus*. De l'ensemble de ces observations, j'ai pu dresser le tableau suivant de différenciation de ces deux espèces bactériennes.

TABLEAU LII

Etude comparative de *B. caryocyaneus* et *B. cyaneo-fluorescens*.

CARACTÈRES ENVISAGÉS	<i>B. caryocyaneus</i> BEIJERINCK-DUPAIX	<i>B. cyaneo-fluorescens</i> ZANGEMEISTER
<i>Caractères</i>		
<i>morphologiques :</i>		
Forme.....	Plastides parfois ovales, le plus souvent en bâ- tonnets.	Plastides ovales.
Fouets.....	1 fouet polaire. (LASSEUR, VERNIER, DU- PAIX et ZAHL, 1930).	1 à 3 fouets polaires. (LASSEUR, VERNIER, DU- PAIX et ZAHL, 1930).
Coloration par la mé- thode de GRAM.....	Ne prend pas le GRAM.. (décoloré en 5 secondes).	Prend le GRAM.
<i>Caractères de culture :</i>		
Gélatine.....	Liquéfie la gélatine.	Ne liquéfie pas la géla- tine. (ZANGEMEISTER, 1895; MIGULA, 1900; LASSEUR et THIRY, 1900; MATZUSCHITA, 1902).
Milieu synthétique L ₁ .	Fluorescence verte, pig- ment bleu devenant vio- let, puis noir.	Fluorescence verte.
Milieu synthétique L ₂ .	Pigment bleu-violet.	Pigment bleu-violet.
Lait.....	Coloration bleu ardoisé, régulièrement dégradée, peptonisation.	Très légère teinte grise.
Pomme de terre glycé- rinée.....	Le tubercule est entière- ment recouvert d'un enduit bleu-vert très foncé, devenant noir cirage.	Enduit brun noir.
<i>Caractères sérologiques :</i>		
Dilution limite d'agglu- tination en présence de sérum <i>B. caryo- cyaneus</i>	1/100.000	0

Le tableau ci-dessus résume tout d'abord les différences essentielles que l'on observe dans les caractères morphologiques et les caractères cultureux de *B. caryocyaneus* et de *B. cyaneo-fluorescens*. Les réactions sérologiques confirment les conclusions fournies par l'examen de la forme et de la vie

des Bactéries dans les différents milieux. Cet ensemble de faits sépare nettement *B. caryocyaneus* BEIJERINCK-DUPAIX de *B. cyaneo-fluorescens* ZANGEMEISTER.

De *B. caryocyaneus*, il faut rapprocher la Bactérie chromogène décrite par MILDENBERG (1922). L'auteur n'a pas nommé la Bactérie qu'il a isolée de l'air, il s'est borné à l'étudier comparativement avec *B. cyanogenus*. Malheureusement, MILDENBERG a omis l'étude des caractères sérologiques, qui, on le sait peuvent être d'une grande utilité dans les recherches de ce genre. J'indique dans le tableau ci-dessous les caractères différentiels de *B. caryocyaneus* et du Bacille de MILDENBERG.

TABLEAU LIII

Caractères différentiels de *B. caryocyaneus*
et du Bacille bleu de MILDENBERG.

CARACTÈRES mis en parallèle	<i>B. caryocyaneus</i> BEIJERINCK-DUPAIX	Bacille bleu de MILDENBERG
Fouets.....	un fouet polaire	un à plusieurs fouets polaires.
Coloration des colonies.....	blanc jaunâtre. Le milieu nutritif présente une fluorescence verte, puis une coloration brune.	bleu acier devenant bleu foncé, puis violet pourpre. Après 3 à 4 semaines, la coloration passe au bleu-vert, puis au vert et pâlit peu à peu.
Culture en bouillon.....	trouble intense; voile grimpant, irisé, plissé; fluorescence verte intense.	trouble faible; pellicule; légère coloration vert jaune puis jaunâtre du liquide.
Culture sur lait...	pas de coagulation; peptonisation; anneau noir; sur toute la hauteur de la colonne liquide, stratification régulière de zones de coloration dégradée (gris-bleu, bleu-ardoisé, bleu-vert).	coagulation partielle, le lait non caillé reste incolore.

ACTION DE DIFFÉRENTS RÉACTIFS CHIMIQUES SUR LE PIGMENT

Ammoniaque.....	coloration vert pomme	coloration bleu-violet sale.
Soude.....	coloration vert pomme	coloration verte.
Acide chlorhydrique.....	coloration bleu-violet	coloration rouge.

Il est impossible de pousser plus loin cette différenciation entre les deux germes. MILDENBERG, dans sa description, s'est limité à l'étude des caractères morphologiques et à celle des caractères culturels relatifs à la chromogénèse.

Le lecteur spécialisé sera peut-être étonné si je m'efforce, dans les lignes qui vont suivre, de différencier *B. caryocyaneus* de *B. pyocyaneus*. Je suis cependant conduit à faire cette étude comparative par une phrase extraite des notes inédites de BEIJERINCK: « *Pseudomonas caryocyaneus* est étroitement apparenté à *Ps. pyocyaneus* GESSARD, mais constitue pourtant une espèce différente... Le pigment bleu « caryocyanine » ressemble beaucoup à la pyocyanine ». En effectuant ce rapprochement, l'illustre savant hollandais désirait vraisemblablement laisser des points de repère au lecteur futur, car il est assez difficile de confondre *B. caryocyaneus* et *B. pyocyaneus*.

Je ne puis entrer dans une étude parallèle de *B. caryocyaneus* et *B. pyocyaneus* (1) aussi complète que celle que je viens de faire pour *B. caryocyaneus* et *B. cyaneo-fluorescens*. Je me contenterai de signaler dans le tableau suivant quelques-uns des caractères séparant ces deux formes microbiennes.

TABLEAU LIV

Différenciation de *B. caryocyaneus* et de *B. pyocyaneus*.

CARACTÈRES DIFFÉRENTIELS	<i>B. caryocyaneus</i> BEIJERINCK-DUPAIX	<i>B. pyocyaneus</i> <i>pyocyanogenes</i> GESSARD
Odeur des cultures.....	Odeur putride	Odeur de coumarine
Dilution limite d'agglutination en présence de sérum — <i>B.</i> <i>caryocyaneus</i>	1/100.000	0
Spectre d'absorption du pigment dans la partie visible du spec- tre.....	$\lambda = 616,5-610$ à $\lambda = 578-570$	$\lambda = 730$ à $\lambda = 641$ (LASSEUR et GIRAR- DET, 1926)
Pouvoir pathogène pour les animaux à sang chaud.....	Germe dépourvu de pouvoir pathogène	Germe pathogène

(1) La Bactérie du pus bleu n'est guère connue aujourd'hui que sous le nom de *B. pyocyaneus* GESSARD 1882, cependant, il ne faut pas oublier qu'elle a été décrite par SCHRÖTTER en 1872, sous le nom de *Bact. aeruginosum*, et en 1886 sous le nom de *B. aeruginosus*; MIGULA (1900) la range dans son genre *Pseudomonas* et la désigne sous le nom de *Ps. aeruginosa*.

On ne saurait donc en aucune manière rapprocher *B. caryocyaneus* de *B. pyocyaneus*. Les caractères culturels fournissent de nombreux points de différenciation et l'agglutination hétérologue ne révèle aucune parenté entre le germe isolé par BEIJERINCK et *B. pyocyaneus* GESSARD.

La place de *B. caryocyaneus* dans la systématique ayant été précisée, sa différenciation avec trois formes voisines étant établie, il nous reste à étudier les affinités de *B. caryocyaneus* avec les autres Bactéries chromogènes.

Recherche des affinités de *B. caryocyaneus* avec les espèces voisines

P. VUILLEMIN estime avec raison que pour apprécier les indices d'affinité entre les différentes espèces bactériennes, on doit noter :

1° « la forme des éléments (plastides), le nombre, la répartition des fouets moteurs, la coloration par divers procédés ;

2° la division des éléments suivant 1, 2, 3 directions déterminées ou sans direction fixe, la forme des colonies, les propriétés des milieux de culture favorables, leurs modifications par la vie des bactéries et les fermentations bactériennes, réciproquement la variation des éléments et des colonies en fonction du milieu ;

3° la sporulation ;

4° les inoculations ;

5° les séroréactions. »

et j'ajouterai :

6° les caractères physico-chimiques des suspensions.

Pour essayer d'établir les affinités entre *B. caryocyaneus* et les Bactéries chromogènes, j'ai cultivé un certain nombre d'entre elles (celles qui m'ont paru les plus voisines) sur les différents milieux nutritifs et noté avec soin leurs caractères morphologiques et sérologiques. Cette étude comparative ne m'a pas conduite à des faits nouveaux bien importants et l'exposé des résultats obtenus compliquerait singulièrement la composition typographique de ce travail. Aussi, pour des raisons d'économie (1) je me bornerai à l'étude de la « parenté humorale » et même dans ce cas particulier, je me limiterai au phénomène de CHARRIN et ROGER.

Pendant longtemps les bactériologistes se sont contentés d'utiliser l'agglutination dans le but d'identifier l'anticorps ou l'antigène et partant de cette conception des choses, ils ne considéraient que la spécificité de la réac-

(1) Je tiens à la disposition du Lecteur tous les résultats inédits qui ne figurent pas dans ce chapitre.

tion : agglutination homologue et coagglutination. Puis à la suite de nombreuses recherches et en particulier de celles de NICOLLE, de MAGNUS et FRIENDENTHAL (1906), de SCHEPOTIEFF (1912), de GOHLKE (1913), la conception des réactions anticorps a évolué et aujourd'hui on s'adresse aux réactions anticorps non seulement pour la diagnose de l'antigène et de l'anticorps, mais encore pour établir des affinités que la morphologie et les caractères culturels sont incapables de déceler. C'est un point sur lequel G. BOHN et A. DRZEWINA (1920) ont particulièrement insisté. « *Les essais faits dans cette voie ne bouleverseront probablement aucune des notions acquises sur la classification des êtres. Mais ils sont susceptibles de résoudre plus d'un problème litigieux, d'établir des rapprochements ou bien des antagonistes insoupçonnés, et d'étayer solidement cette vue que les caractères morphologiques ne sont que la manifestation d'un chimisme interne. Il y a une singulière satisfaction pour l'esprit de constater que des êtres qui, pour des raisons morphologiques, étaient envisagés comme appartenant à des espèces voisines, offrent en même temps une parenté chimique, une parenté « humorale »...* ».

Ne pouvant pas faire porter mes recherches sur des centaines de Bactéries je me suis limitée aux germes qui présentent une affinité plus ou moins grande avec *B. caryocyaneus* et notamment aux Bactéries fluorescentes. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau ci-dessous :

TABLEAU LV

Anticorps = agglutinine — *B. caryocyaneus* (B) (sérum de Lapin préparé avec des plastides de *B. caryocyaneus*, type normal).

DÉSIGNATION des Bactéries expérimentées	DILUTION LIMITE D'AGGLUTINATION
<i>B. caryocyaneus</i> , souche B (type normal).....	1/100.000
<i>B. caryocyaneus</i> , souche F (modification fluorescente)..	1/100.000
<i>B. chlororaphis</i> GUIGNARD et SAUVAGEAU 1894.....	1/800
Bacille fluorescent liquéfiant de CHAPMAN (<i>in litt.</i>)....	1/100
Bacille fluorescent liquéfiant HIRBQUELLWASSER (<i>in litt.</i>)..	1/100
<i>B. cyaneo-fluorescens</i> ZANGEMEISTER 1895.....	0
<i>B. pyocyaneus pyocyanogenes</i> GESSARD 1882.....	0
Bacille fluorescent du mucus nasal JAISER (<i>in litt.</i>)....	0
<i>B. fluorescens putidus</i> FLUGGE 1886.....	0
<i>B. cyanogenus</i> FLUGGE 1886.....	0
Bacille fluorescent pathogène pour les plantes ZACH. (<i>in litt.</i>)	0
<i>B. fluorescens albus</i> ZIMMERMANN 1890.....	0
<i>B. fluorescens aureus</i> ZIMMERMANN 1890.....	0

Il est curieux de constater que *B. chlororaphis* est agglutiné à la dilution 1/800, alors que *B. cyaneo-fluorescens* n'est pas agglutiné à la dilution 1/100 et cependant la caryocyanine est plus voisine du pigment secrété par *B. cyaneo-fluorescens* que de la substance cristallisée produite par *B. chlororaphis*. Si ce rapprochement peut paraître singulier au premier abord, il n'en est plus ainsi lorsqu'on compare entre eux non plus un ou deux caractères (pouvoir pathogène, pouvoir chromogène), mais l'ensemble des caractères morphologiques, cultureux et sérologiques : *B. caryocyaneus* et *B. chlororaphis* se séparant nettement en effet : 1° par la production de deux matières chromogènes différentes ; 2° par la façon dont ils se comportent vis-à-vis des animaux à sang chaud. Ils présentent néanmoins un certain nombre de caractères morphologiques et cultureux communs.

L'agglutination décèle encore une parenté humorale entre *B. caryocyaneus* et le Bacille fluorescent liquéfiant de CHAPMEN, le Bacille fluorescent liquéfiant HIRBQUELLWASSER, tandis que *B. cyaneo-fluorescens* ZANGEMEISTER et *B. pyocyaneus* GESSARD se comportent comme des germes très éloignés de *B. caryocyaneus*.

« On voit ainsi se dessiner une véritable bio-chimie comparée des espèces, plus précise, plus pénétrante que la morphologie comparée, parce qu'elle nous initie, ou bien plutôt parce qu'elle est susceptible de nous initier aux modes d'activité des molécules mêmes des protoplasmes » (G. BOHN et A. DRZEWINA : *La chimie et la vie*, 1920, p. 251).

BIBLIOGRAPHIE

- BERGEY (D.-H.). — *Bergey's manual of determinative bacteriology*, Williams et Wilkins Company, Baltimore, 1923.
- BEIJERINCK (M.-W.). — *Arch. Neerland. des Sciences exactes et naturelles*, T. XXV, p. 227-280, 1892.
- BLANCHARD (R.). — *Compte rendu des séances du Congrès international de Zoologie*, Paris, p. 419-424, 1889.
- CUÉNOT (L.). — *La genèse des Espèces animales*; Alcan, Paris, 2^e édition, 547 pages, 1921.
- GRIMBERT (L.). — *Archiv. Parasitol.*, T. I, n° 2, p. 191, 1893; Thèse médecine Paris, 1903.
- MATZUSCHITA (T.). — *Bacteriologische Diagnostik*, Fischer, Jena, 690 pages, 1902.
- MIGULA (W.). — *System der Bakterien. Spezielle Systematik der Bakterien*. Fischer, Jena, Bd. I, 368 pages, 1897; Bd. II, 1068 pages, 1900.
- VUILLEMIN (P.). — *Soc. des Sciences*, Nancy, mars 1899 (tirage à part, 14 pages); *Ann. mycologici*, vol. XI, n° 6, p. 512-527, 1913; *Encyclopédie biologique*; IV, *Les animaux infectieux*, p. 16, Lechevalier, Paris, 1929.
- ZANGEMEISTER (W.). — *Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Orig.*, Bd. XVIII, p. 321-324, 1895.

DEUXIEME PARTIE

Recherches sur le mécanisme du Phénomène de CHARRIN et ROGER

(Agglutination sérique des Bactéries)

J'aurais pu limiter mon travail aux sept chapitres précédents. Mais, afin d'assurer une plus grande diffusion aux différents travaux que nous avons publiés M. le Professeur LASSEUR et moi dans les fascicules des « Travaux du Laboratoire de Microbiologie », j'ai, sur les conseils de mon Maître, résumé, dans la seconde partie de ce volume, les grandes lignes de nos recherches sur le phénomène de CHARRIN et ROGER.

RECHERCHES SUR LE MÉCANISME DU PHÉNOMÈNE DE CHARRIN ET ROGER⁽¹⁾ (Agglutination sérique des Bactéries)

CHAPITRE I

DÉCOUVERTE DE L'AGGLUTINATION

CHARRIN et ROGER se sont préoccupés, après NUTTAL, des transformations possibles chez l'animal guéri ou vacciné. Et dans leur note du 4 novembre 1889, ces savants relatent les résultats obtenus en ensemençant *B. pyocyaneus* dans du sérum de Lapin normal et dans du sérum de Lapin vacciné. L'examen comparatif des cultures ainsi obtenues montre « *une modification d'aspect qui est assez curieuse, tandis que le sérum des lapins normaux est complètement opaque, celui des vaccinés peut rester clair; les microbes sont réunis en petits amas qui s'éparpillent quand on agite le tube, mais retombent au fond quand on le laisse au repos* » (p. 712).

Cette première observation est complétée par la note du 23 novembre 1889, dans laquelle le phénomène est étudié au point de vue macroscopique. Là encore, « *le sérum de l'animal réfractaire est clair et transparent; les microbes sont réunis en petits grumeaux, qui s'éparpillent quand on agite le tube, mais retombent au fond quand on le laisse au repos* » (p. 667-668). Les plastides « *ont une grande tendance à se grouper et, au lieu de nager librement comme les bacilles normaux, on les voit s'enchevêtrer en petits amas, ce qui explique sans doute l'aspect grumeleux des cultures* » (p. 668).

Esquissée le 4 novembre 1889, l'agglutination sérique du Bacille pyocyaneux a donc été précisée le 23 novembre 1889, soit environ 6 ans et demi avant les travaux de M. GRUBER et H. DURHAM (31 mars 1896)

(1) Pour la rédaction de cette seconde partie, j'ai fait de larges emprunts à différents mémoires publiés en collaboration avec M. le Professeur LASSEUR.

et ceux de F. WIDAL (26 juin 1896) sur l'agglomération sérique des Vibrions cholériques et des Bacilles typhiques.

On doit donc considérer CHARRIN et ROGER comme des novateurs (1). D'ailleurs, WIDAL et SICARD en donnent l'exemple dans leur note du 19 décembre 1896 (p. 1073).

Généralités.

Depuis l'observation mémorable de CHARRIN et ROGER (4 novembre 1889), l'agglutination sérique des Bactéries a suscité une multitude de recherches. Si les auteurs de nombreux travaux ont surtout pour objectif l'application du phénomène de CHARRIN et ROGER (réaction de GRUBER et WIDAL), un nombre imposant de savants se sont proposés l'étude du mécanisme du phénomène découvert par CHARRIN et ROGER.

Malgré la valeur des chercheurs, la multiplicité des publications, les efforts soutenus par les différentes Ecoles, le mécanisme de l'agglutination n'est encore qu'esquissé, mais il s'oriente nettement vers les théories physico-chimiques. Il est donc bien naturel qu'un jeune chercheur ait été séduit par l'attrait présenté par l'étude du mécanisme de l'agglutination sérique des Bactéries, bien convaincu de ne pas résoudre le problème, mais désireux seulement d'apporter une modeste contribution à l'étude d'une question d'aussi grande envergure et d'aussi longue haleine.

J'ai été d'autant plus enclin à poursuivre cette étude que depuis de longues années j'ai eu l'occasion de suivre des recherches analogues effectuées au Laboratoire qui me donne si généreusement l'hospitalité. De plus, et ce point a quelque valeur, *B. caryocyaneus* constitue un matériel presque idéal pour des recherches de ce genre; doué d'un pouvoir agglutinogène élevé (sérum agglutinant dont la dilution limite dépasse le 1/100.000) d'une haute agglutinabilité, il permet d'étudier l'agglutination dans des systèmes pauvres en sérum. Or, LASSEUR a depuis longtemps montré qu'il faut éviter les causes de complication apportées par les éléments étrangers dans l'étude des réactions anticorps. *B. caryocyaneus* étant dépourvu de tout pouvoir pathogène pour l'homme, il peut par conséquent être manipulé sans précautions spéciales. En outre, bien que sécrétant des matières colorées, les plastides de *B. caryocyaneus* ne sont pas fortement imprégnées de pig-

(1) Pour de plus amples renseignements historiques, je renvoie le Lecteur à l'article « *Phénomène de CHARRIN et ROGER : Un point d'histoire* », publié par M. le Professeur LASSEUR dans le volume jubilaire de M. le Professeur ROGER, 1932.

ment et par lavages on les débarrasse très facilement des matériaux provenant du milieu nutritif. Le germe isolé par BEIJERINCK se présente sous forme de diplobacilles et de plastides isolées et après agitation avec des billes de verre et centrifugation fractionnée, on obtient des suspensions très stables et très homogènes.

A ces considérations, j'ajouterai un point capital, le mécanisme des réactions anticorps rentre dans les préoccupations journalières de M. le Professeur LASSEUR et de ce fait, j'étais assurée de trouver dans mon Maître le guide le plus sûr et l'apôtre le plus enthousiaste que l'on puisse espérer.

Ces explications étant données, je décrirai brièvement les principaux facteurs de stabilité et d'instabilité des suspensions bactériennes. Ces généralités auront pour but de laisser des points de repère au Lecteur non spécialisé dans ce genre d'étude et de le guider dans un exposé souvent aride.

Facteurs de stabilité et d'instabilité des suspensions bactériennes

MOUVEMENT BROWNIEN

MOUVEMENT VITAL

Considérons une suspension homogène de *Cocci* dans l'eau physiologique, chaque plastide par suite du choc cinétique est animée d'un mouvement irrégulier (mouvement brownien) qui la soustrait à l'action de la pesanteur et la maintient en suspension. S'il s'agit de plastides munies de fouets, le mouvement vital agit différemment suivant que l'on s'adresse à des Bactéries aérobies ou anaérobies. Dans tous les cas, l'intensité de ces deux mouvements varie avec les dimensions, l'âge des plastides la viscosité, la température, la réaction du milieu, etc...

Soient deux plastides P_1 et P_2 éloignées l'une de l'autre d'une distance L , par suite des déplacements ci-dessus, les plastides au bout d'un temps t devraient arriver à se rencontrer; il y aurait choc, et les éléments pourraient rester accolés. Comment se fait-il que les suspensions bactériennes puissent rester homogènes, au moins pendant un certain temps ?

CHARGE ELECTRIQUE

Pour expliquer cette stabilité temporaire des suspensions bactériennes, nous devons faire appel à un autre facteur d'action : la différence de potentiel entre les plastides et le liquide dispersif. Dans l'eau distillée, les Bactéries lavées sont chargées négativement et on suppose avec quelque vraisemblance que c'est cette répulsion due à la charge électrique des plastides qui les préserve d'un contact mutuel incessant. Cette force de répulsion n'est pas immuable ; en effet, si on abaisse la charge électrique par fixation d'ions positifs, la force de répulsion diminue. Pour un potentiel nul, la répulsion ne se manifeste pas ; mais si on continue à fixer des ions positifs sur les plastides, elles acquièrent un potentiel positif et les forces de répulsion réapparaissent. En résumé, par addition ménagée d'ions positifs, la stabilité de la suspension bactérienne décroît, passe par un minimum puis croît à nouveau.

Le mouvement brownien et la charge électrique peuvent être dépendants l'un de l'autre et dans certains cas, le mouvement brownien diminue à mesure que la charge électrique décroît.

FORCE DE COHESION — FORCE CAPILLAIRE TENSION SUPERFICIELLE

SPHERE D'ATTRACTION — CHOC — VISCOSITE

La force de répulsion maintenant les plastides éloignées, on peut imaginer l'existence d'une force antagoniste (tension superficielle, tension interfaciale, force d'attraction capillaire) qui tend à rapprocher les éléments bactériens. L'existence de cette force peut être mise en évidence par l'examen microscopique d'un système agglutinant où la formation des amas est lente. Pour que l'attraction puisse se manifester entre deux plastides A et B, il est nécessaire que la distance qui sépare A de B soit inférieure ou égale à une certaine valeur L.

Il est à remarquer que les plastides restent d'autant plus facilement accoïées à un amas ou à une autre plastide que l'intensité du choc a été plus grande. La viscosité du milieu, diminuant la vitesse de déplacement des Bactéries, s'oppose dans une certaine mesure à l'agglomération des éléments bactériens et à leur sédimentation ultérieure.

PROTECTION

Certaines substances (colloïdes, électrolytes) ont la faculté de stabiliser les suspensions bactériennes. Il en est de même du chauffage à 80° C. Ce dernier facteur est du moins très important pour un grand nombre de Bactéries. En ce qui concerne la protection par les colloïdes, elle ne s'observe que dans des conditions déterminées. Dans d'autres conditions les substances protectrices augmentent la sensibilité de la phase dispersée à l'action des agents précipitants.

pH — MOUILLABILITE

Nous avons parlé de la charge des Bactéries, mais la différence de potentiel entre les plastides et le liquide dispersif peut être modifiée par adsorption d'ions H^+ ; ainsi s'explique l'action du pH des systèmes agglutinants. Enfin, un élément figuré ne pourra être influencé par une substance en solution aqueuse, qu'autant que cet élément sera mouillable (1).

DIMENSIONS DES PARTICULES DISPERSEES

Si l'on opère sur des éléments microbiens de l'ordre de 2, 3, 4 μ , au lieu de faire porter les essais sur des particules de l'ordre de 0,5 — 1 μ , les facteurs d'action n'interviennent pas de la même façon. Ainsi, dans le premier cas le rôle du mouvement brownien sera faible ou nul et on assistera à une sédimentation rapide des particules dispersées.

Notion de potentiel critique

L'expérience a montré que l'agglutination a lieu bien avant le point isoélectrique. Pour NORTHROP l'agglutination se produit chaque fois que la différence de potentiel de cataphorèse est inférieure à 13 millivolts en valeur absolue, c'est-à-dire qu'il y aura agglutination pour une différence de potentiel variant de + 13 mv à 0 et de 0 à — 13 mv ; à — 15 mv ou à + 15 mv les suspensions seraient stables. Ce qui semble donner une cer-

(1) Certaines spores, notamment celles d'*Aspergillus niger*, sont difficilement mouillables.

taine valeur à cette conception, c'est que l'on a obtenu des différences de potentiel critiques pour les substances les plus diverses (huile, air, collodion, Bactéries). Il ne faut pas oublier que cette théorie très simple paraissant contenir une grande part de vérité, n'est, cependant, qu'une théorie partielle. Elle n'explique pas tous les faits observés, on est obligé de faire intervenir une autre notion, soit celle de destruction des ions stabilisants au sens de BOUTARIC, soit encore celle d'adsorption orientée, telle qu'elle a été définie par les auteurs américains.

Depuis les travaux de LIPPMANN, on connaît la relation qui existe entre la tension superficielle et la charge électrique. En première approximation, on conçoit que l'équilibre des suspensions bactériennes puisse être considéré comme une résultante R :

$$R = Fr - Fa$$

Fr = force de répulsion due à la charge électrique.

Fa = force d'attraction .

Si l'on diminue Fr, Fa restant constante, il y aura agglutination. Le même phénomène se produira si Fa augmente, Fr restant constante. Enfin, les 2 forces peuvent varier simultanément, Fr diminuer et Fa augmenter, dans ce cas l'agglutination sera rapide (cas théorique).

AGITATION

Dans l'agglutination on fait agir l'anticorps sur les plastides bactériennes. Or, nous venons de voir d'une part, que ces dernières ne restent pas régulièrement réparties dans le liquide dispersif. D'autre part, l'anticorps, qui ne peut être conçu que comme un complexe protéique, a une diffusion assez lente ; par suite, la vitesse des réactions anticorps sera augmentée par un brassage convenable du système qui aura pour but de mettre en présence les deux substances réagissantes.

TEMPERATURE

Ainsi qu'il fallait s'y attendre, dans la mesure où elle n'altère pas les plastides bactériennes et les constituants du sérum, l'élévation de température augmente la vitesse de réaction.

Fixation de l'anticorps

Nous avons vu dans un précédent travail que la fixation de l'agglutinine sur les plastides bactériennes diminue la charge de l'élément bactérien (LASSEUR, FRIBOURG, DUPAIX), mais l'agglutination n'a lieu qu'en présence d'une quantité convenable d'électrolytes. Ce qui nous conduit à considérer deux temps dans l'agglutination.

PREMIER TEMPS

Fixation de l'anticorps sur l'antigène par adsorption. Cette fixation peut s'effectuer en présence de traces d'électrolytes; mais il ne semble pas qu'elle puisse se réaliser en l'absence complète d'électrolytes (LASSEUR et NOBLAT, 1928).

En raison de la faible concentration en ions positifs, la variation de potentiel est extrêmement petite et passe inaperçue à l'échelle de nos observations. C'est ainsi que les plastides ayant fixé l'agglutinine dans les milieux très pauvres en électrolytes sont transportées à l'anode avec une vitesse sensiblement égale à celle des plastides non imprégnées d'agglutinine. C'est un point sur lequel LASSEUR a longuement insisté en 1921.

DEUXIEME TEMPS

Il y a adsorption d'ions positifs, ions Na^+ par exemple, donc diminution de la charge des plastides.

ADSORPTION

On sait que HEIDELBERGER et KENDALL dans leurs belles recherches sur la synthèse de l'antigène ont été conduits incidemment à vérifier si les réactions anticorps suivent la loi d'action de masse. J'ai eu l'occasion de développer ce point dans un article antérieur (1). Je me contenterai de faire observer que les faits relatés par HEIDELBERGER et KENDALL n'infirmement nullement la théorie de l'adsorption. Et avec la majorité des auteurs je

(1) Bulletin de l'Association des Diplômés de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy, n° 3, février 1932.

ramènerai les réactions anticorps à un phénomène d'adsorption, en faisant remarquer toutefois que LASSEUR, avec juste raison, fait intervenir les deux processus : adsorption et absorption. Pour cet auteur, l'adsorption prédomine et imprime son cachet au processus de fixation de l'anticorps.

ADSORPTION ORIENTÉE. — On peut imaginer l'anticorps, comme ajusté à la surface de l'antigène. Lorsqu'un anticorps est adsorbé par un antigène en milieu aqueux, ce qui est la règle dans nos opérations de laboratoire, la partie la plus polaire de la molécule anticorps s'enfonce dans l'eau en produisant une adsorption orientée ; si l'extrémité de la molécule dirigée vers l'eau ressemble le plus possible à l'eau, l'extrémité dirigée vers l'antigène ressemble le plus possible à l'antigène. L'orientation des molécules adsorbées rendrait compte de la spécificité de la réaction.

CHAPITRE II

RECHERCHES PERSONNELLES SUR LE MÉCANISME DU PHÉNOMÈNE DE CHARRIN ET ROGER

Dans ces recherches, je me suis proposée d'étudier l'action de différents paramètres sur la marche du phénomène de CHARRIN et ROGER et en particulier le rôle de la charge électrique, du pH, du chauffage à 80° C., de la tension superficielle, de la viscosité et de la conductibilité des suspensions bactériennes.

Transport électrique. - Différence de potentiel

Les différentes techniques que j'ai utilisées pour étudier le transport électrique des Bactéries peuvent se ramener à deux groupes de procédés : procédé microscopique, procédé macroscopique.

1° PROCÉDÉ MICROSCOPIQUE. — Le procédé microscopique utilisé est une variante de celui décrit par COTTON et MOUTON et il diffère légèrement du dispositif adopté par LASSEUR et FRIBOURG dans leurs recherches sur le transport électrique des plastides bactériennes (1928). L'appareil employé actuellement au Laboratoire est en effet construit avec des verres travaillés optiquement.

2° PROCÉDÉ MACROSCOPIQUE. — En collaboration avec M. le Professeur LASSEUR et mon excellent camarade FRIBOURG, j'ai effectué quelques mesures de transport macroscopique à l'aide de l'appareil décrit et schématisé dans le fascicule III des Travaux du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy (p. 166).

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Le transport électrique a été effectué sur des suspensions réalisées dans l'eau et dans l'eau distillée additionnée de différentes substances.

L'ensemble de ces recherches montre que :

1° les plastides de *B. caryocyanus* en suspension dans l'eau distillée sont

transportées au pôle positif quelles que soient les cultures dont elles proviennent :

2° avec les ions H^+ et le Rouge neutre l'agglutination a lieu avant le point isoélectrique.

3° avec le sérum homologue dilué et des doses croissantes de $NaCl$, la vitesse de transport diminue à mesure que croît la concentration en $NaCl$; mais l'agglutination se produit avant le point isoélectrique. La règle de HARDY-SCHULZE ne peut donc pas être appliquée à l'agglutination des Bactéries. Cependant comme il paraît exister une relation directe entre la stabilité des suspensions et le potentiel, il nous semble logique de parler de différence de potentiel critique. La précipitation des plastides a lieu lorsque, par un moyen quelconque, on abaisse la D. P. au-dessous de cette limite critique, mais il ne s'agit là que d'une première approximation, et avant de serrer de plus près la question, j'envisagerai tout d'abord l'action du pH dans l'agglutination.

pH et agglutination

Les recherches précédentes semblent démontrer que la charge joue un rôle important dans l'agglutination sérique des Bactéries, mais à la notion de point isoélectrique, il faut substituer celle de D. P. critique; cette notion est susceptible de généralisation et il est remarquable que des systèmes aussi différents qu'une suspension de collodion, une émulsion d'air, une émulsion d'huile, une suspension de Bacilles typhiques puissent offrir des différences de potentiel maxima et critiques du même ordre: D. P. de 70 millivolts (huile — PÖWIS), 70 mlvt. (collodion — LOEB), 55 mlvt. (bulles d'air — Mc TAGGART); D. P. critiques de 13 mlvt. (Bacille typhique — NOR-THROP), 16 mlvt. (collodion — LOEB), 30 mlvt. (huile — PÖWIS).

« Cette théorie est très simple et semble contenir une grande part de vérité. Toutefois, elle n'est pas en accord avec tous les faits observés. En particulier, elle n'explique pas la floculation qui s'observe dans certains cas par mélange de solutions colloïdales dont les particules ont le même signe... Une autre théorie de la floculation mutuelle des solutions colloïdales attribue cette floculation à la destruction par réaction mutuelle des traces des électrolytes qui, dans les deux solutions colloïdales, jouent le rôle de stabilisant ou de peptisant » (BOUTARIC, 1931).

Dans un mémoire antérieur nous avons décrit la précipitation spontanée de certaines cultures lorsque la réaction du milieu atteignait un pH déter-

miné. D'après NORTHROP (1), MICHAELIS « *l'anticorps est positif du côté acide, au-dessus de $pH = 5,0$, de sorte qu'on peut attendre son effet maximum entre ce point et $pH = 3,0$* ».

LOEB a montré que les 4 propriétés colloïdales : viscosité, pression osmotique, gonflement et différence de potentiel de cataphorèse sont minima au point isoélectrique. Il est donc possible de déterminer la position approchée du point isoélectrique (2) par la variation de volume des particules de la phase dispersée.

Ce sont ces considérations qui nous ont conduits à étudier systématiquement l'action de la concentration des ions H^+ :

- 1) sur la marche générale de l'agglutination ;
- 2) sur le volume des plastides bactériennes.

ACTION DU pH SUR LA MARCHÉ GÉNÉRALE DE L'AGGLUTINATION

TECHNIQUE.

A. PRÉPARATION DES SUSPENSIONS. — Des cultures sur gélose peptone de $pH = 7$, âgées de 40 heures sont mises en suspension dans l'eau physiologique. Après 3 lavages, on procède à une agitation (3) avec des billes de verre et à une légère centrifugation (4). On obtient ainsi une suspension parfaitement homogène renfermant de 4 à 400 milliards de germes au cm^3 , suivant qu'il s'agit d'étudier l'action du pH sur la marche de l'agglutination ou l'action du pH sur le volume des corps microbiens.

Pour la première étude on réalise, à l'aide de cette suspension-mère, des suspensions de pH variables, renfermant de 4 à 8 milliards de germes au cm^3 suivant les essais. A une partie de ces suspensions on ajoute ensuite une partie de sérum de dilution croissante.

(1) in *Traité de Chimie colloïdale* Robert Herman BOGUE, 1928, p. 78.

(2) « *Le point isoélectrique... correspond à un minimum de solubilité, un maximum d'instabilité en solution (floculation), une viscosité minima, une liaison minima avec les électrolytes périphériques... un maximum ou un minimum de propriétés optiques (pouvoir rotatoire; diffusion VLÈS et VELLINGER)...* » (VLÈS (F.) et de COULON (A.), 1929, p. 3.

(3) L'agitation étant réalisée à la main, son intensité est telle qu'elle dissocie les amas existants, mais qu'elle ne détermine pas d'altération sensible des plastides.

(4) Le Lecteur trouvera une technique plus détaillée dans les fascicules I, II, III et IV des Travaux du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy.

Dans une première série d'essais, la concentration des systèmes en électrolytes a varié de 14 gr. à 18 gr. 500 o/oo suivant le pH considéré. Dans une deuxième série d'expériences les lavages ont été effectués dans l'eau distillée de sorte que la concentration en électrolytes des différents systèmes a varié de 9 gr. à 11 gr. 500 par litre suivant le pH considéré. L'expérimentation a porté sur *B. caryocyanus*, *B. chlororaphis* et *B. prodigiosus*.

B. PRÉPARATION DES SOLUTIONS TAMPONS. — Les solutions tampons ont été préparées d'après les indications données par CLARK (1923, p. 116 et suivantes). Malgré les inconvénients présentés par les solutions de phosphate disodique + acide citrique (1), nous avons utilisé les solutions préconisées par Mc ILVAINE (1921) parce qu'elles offrent une zone de variation très large dans la concentration des ions H+.

En dehors des solutions : phosphate disodique + acide citrique, nous avons employé les solutions tampons suivantes :

1. acide borique + chlorure de potassium + soude (CLARK et LUBS, 1916).
2. phosphate disodique + soude (RINGER).
3. phthalate acide de potasse + soude (CLARK et LUBS, 1916).
4. phthalate acide de potasse + acide chlorhydrique (CLARK et LUBS, 1916).
5. citrate de soude + acide chlorhydrique (SÖRENSEN).
6. acide acétique + acétate de soude (WALPOLE).
7. phosphate monopotassique + soude (CLARK et LUBS, 1916).

Bien que nous les ayons préparées avec des produits spécialement purifiés, nous avons toujours procédé à la détermination électrométrique du pH des solutions tampons.

C. MÉTHODE DE MESURE DU pH. — Toutes les mesures ont été effectuées par voie électrométrique. Dans nos tableaux nous avons fait figurer deux décimales, mais il ne faut pas oublier qu'avec le matériel utilisé, seule la première décimale a un sens.

D. PROTOCOLE D'AGGLUTINATION.

Nous avons adopté deux types de protocole.

Dans le premier schéma, 2 cm³ de suspension bactérienne sont additionnés de 2 cm³ de dilution croissante de sérum. On mélange, puis les systèmes sont mis à l'étuve à 37° C. On procède à la lecture des résultats après des temps de 15', 30', 1 heure, 1 h. 1/2, 2 heures, 4 heures et 12 heures.

(1) Elles doivent être employées dans les heures qui suivent leur préparation.

Dans le second type d'expériences, nous avons choisi une dilution de sérum assez élevée: 1/1000 ou 1/2000 suivant l'intensité du pouvoir agglutinant du sérum expérimenté. Le choix de cette concentration a été imposé par la nécessité d'obtenir une agglutination assez forte tout en ne faisant intervenir qu'une faible quantité de protéines.

Toutes les expériences sont effectuées en double ou en triple exemplaire.

Les vases utilisés sont en verre résistant tel que verre Pyrex, verre Sibor, etc...

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Les résultats obtenus dans la première et la deuxième série d'expériences sont consignés dans les tableaux I et II. Nous envisagerons tout d'abord les faits observés dans la première catégorie d'expériences, c'est-à-dire avec les systèmes offrant la concentration la plus élevée en électrolytes.

TABLEAU I

1^{re} série.

Antigène = *B. caryocyaneus* (B) (1).

Anticorps = sérum-*B. caryocyaneus*.

(concentration des systèmes en électrolytes: 14 gr. à 18 gr. 500 o/oo).

pH des solutions tampons	pH des suspensions	pH des suspensions additionnées de sérum dilué au		DILUTION LIMITE d'agglutination
		1/100	1/16.000	
2.06	2.09	2.15	2.11	pas d'agglutination
2.19		2.32		pas d'agglutination
2.71	2.76	2.81	2.78	pas d'agglutination
2.96		3.05	3.03	pas d'agglutination
3.37	3.41	3.53	3.42	pas d'agglutination
3.77	3.81	3.93	3.90	1/100
4.05	4.07	4.25	4.23	1/1000
4.85		4.78		1/32.000
5.00		4.90		1/64.000
5.80		6.02	6.00	1/64.000
6.16	6.24	6.30	6.28	1/64.000
8.64	8.77	8.71	8.75	1/32.000

(1) Nous désignons sous le nom de *B. caryocyaneus* (B) la forme normale du germe isolé par BEIJERINCK.

Remarquons tout d'abord que l'addition aux solutions tampons de corps microbiens lavés ne modifie pas considérablement (1) le pH de ces solutions. On observe des faits analogues lorsqu'on ajoute du sérum dilué aux suspensions bactériennes si la dilution du sérum est supérieure au 1/100. Aussi ne ferons-nous figurer dans les tableaux suivants que les valeurs qui paraîtront indispensables à la compréhension du texte.

TABLEAU II

1^{re} série.

Antigène = *B. chlororaphis*.

Anticorps = sérum *B. chlororaphis*.

(concentration des systèmes en électrolytes : 14 gr. à 18 gr. 500 0/00).

pH DES SOLUTIONS TAMPONS	pH DES SUSPENSIONS additionnées de sérum dilué au			DILUTION LIMITE d'agglutination
	1/100	1/2000	1/32000	
2.10	2.23			pas d'agglutination
2.19	2.31		2.26	pas d'agglutination
3.00	3.03	2.98	2.98	1/100
3.94	3.97		3.91	1/500
4.70	4.75	4.74		1/2000
4.85	4.96	4.91	4.85	1/2000
6.65	6.68	6.70		1/2000
8.64	8.30		8.54	1/2000
8.85	8.38	8.49		1/2000
12.05	11.25		11.63	pas d'agglutination

Dans cette série d'expériences, la teneur en électrolytes varie, avons-nous dit, de 14 gr. à 18 gr. 500 par litre suivant le pH considéré. Il est incontestable qu'une quantité aussi élevée d'électrolytes peut compliquer le phénomène que nous étudions; en effet, on connaît l'action des cations monovalents sur la différence de potentiel de cataphorèse. En général, pour un pH de l'ordre de 6, les cations monovalents font croître la différence de potentiel jusqu'à un maximum, puis elle décroît si on augmente

(1) Si on tient compte de la précision avec laquelle le pH peut être déterminé dans des systèmes aussi complexes.

la quantité d'électrolytes apportée. Il est vrai que l'action de l'anion contrebalance souvent celle du cation et peut même arriver à l'annihiler; mais, même en admettant cette compensation, l'action des électrolytes sur la pression osmotique et le gonflement des plastides persistera, et c'est la raison pour laquelle nous avons été conduits à instituer une 2^e série d'expériences dans lesquelles la quantité d'électrolytes varie de 9 gr. à 11 gr. 500 par litre.

De ces essais, il résulte qu'une variation de la concentration en électrolytes de l'ordre de celle que nous avons réalisée ne modifie pas sensiblement la marche générale de l'agglutination.

Des expériences des séries I et II, nous pouvons conclure qu'il n'y a pas agglutination pour des pH de l'ordre de 2 — 2,5. L'agglutination débute vers pH = 4 pour *B. caryocyaneus*, et aux environs de pH = 3 pour *B. chlororaphis*.

Les plus hautes dilutions limites d'agglutination s'observent pour *B. chlororaphis* de pH = 4,75 à pH = 8,38 et pour *B. caryocyaneus* de pH = 4,78 à pH = 6,30. Si on continue à faire croître le pH on constate une diminution de la dilution limite d'agglutination à pH = 8,71 pour *B. caryocyaneus* (1).

D'après MICHAELIS et NORTHROP, l'agglutination doit atteindre son maximum entre pH = 3 et pH = 5. Les faits constatés par ces savants se retrouvent donc, au moins en partie, dans l'agglutination de *B. chlororaphis* et de *B. caryocyaneus*. Tout au plus peut-on dire que dans nos expériences, le maximum d'agglutination est plus près de pH = 5 que de pH = 3.

Là encore, nous sommes d'accord avec MICHAELIS et DAVIDSON (1912), ces savants ayant montré que la marche de la précipitation du sérum de Mouton par un sérum homologue ne subit pas de modification sensible de pH = 5 à pH = 9. Il ne faudrait cependant pas déduire de cette expérience, comme le fait A.-W. THOMAS que la précipitation ne dépend « pas de la concentration en ions hydrogène ».

Dans un autre cas A.-W. THOMAS (1928) paraît donner une interprétation inexacte du phénomène. Rappelant les travaux de P.-H. DE KRUIF et NORTHROP, au sujet de l'agglutination sérique du Bacille typhique cet auteur écrit : « La quantité d'anticorps combinés aux microorganismes était constante de pH = 9 à pH = 3,7 ». Il est vrai que THOMAS est parfaitement ex-

(1) On observe un phénomène analogue dans l'agglutination sérique de *B. prodigiosus*. Dans ce cas, on constate une diminution de la dilution limite d'agglutination à pH = 9.13.

cusable puisque NORTHROP écrit en 1924 : « *Il n'y a pas de différence notable dans la quantité d'anticorps combinés* ». Cette conception des faits ne nous paraît nullement admissible puisque l'examen de la figure 20 du travail de NORTHROP montre que la quantité d'agglutinine fixée passe de 8 à 16 unités lorsque le pH croît de 3 à 4.5. La quantité d'anticorps reste ensuite sensiblement constante de pH = 5 à pH = 8. Les auteurs (THOMAS, NORTHROP) n'ont donc pas le droit de négliger la partie la plus importante de la courbe.

Tels sont, brièvement exposés, les faits que nous avons observés dans ces deux séries d'expériences. Lorsqu'on veut remonter un peu plus loin dans l'explication du phénomène, on se heurte immédiatement à deux nouvelles complications : l'augmentation de la quantité d'électrolytes et la variation de l'opacité des suspensions bactériennes.

1^{re} COMPLICATION.

Lorsqu'on ajoute à un système déterminé des quantités croissantes d'ions H⁺, la D. P. de cataphorèse croît, passe par un maximum, puis décroît (avec d'autres cations monovalents, on observe le même phénomène). Or, dans les deux séries d'expériences ci-dessus, la quantité d'électrolytes décroît à mesure que croît la concentration en ions H⁺. On peut donc avoir une modification de la courbe représentant la valeur de la D. P. en fonction de la concentration en ions H⁺, et on peut atteindre plus ou moins rapidement la différence de potentiel critique.

En résumé, dans ces essais, deux phénomènes se superposent. Cette cause d'erreur n'a peut-être pas une très grande importance, LOEB n'en a jamais tenu compte dans ses recherches cependant mémorables.

2^e COMPLICATION.

Avec les pH très élevés on observe un éclaircissement des suspensions provenant non pas de la précipitation, mais de l'hydratation et de la peptisation des corps microbiens. Les suspensions deviennent extrêmement visqueuses aux pH élevés, et la centrifugation prolongée ne met en évidence qu'un voile membraneux flottant dans le liquide de dispersion. Nous nous contentons de signaler ce fait, devant l'étudier avec détail un peu plus loin.

ACTION DU pH SUR LE VOLUME DES PLASTIDES BACTERIENNES

Ainsi se trouve résumée l'action du pH sur la marche générale de l'agglutination. Nous allons maintenant jeter un coup d'œil assez rapide sur les variations de volume en fonction de la concentration en ions H^+ .

En 1921, LASSEUR constatait que la notion de D. P. critique ne suffisait pas à expliquer tous les phénomènes observés dans l'agglutination sérique des Bactéries et en 1928, il faisait intervenir la notion de « *poids efficace* » au sens de J. PERRIN et de variation de volume des plastides. C'est à la suite des travaux de LANGMUIR que LASSEUR a été conduit à envisager la variation de volume au cours de l'agglutination. LANGMUIR a montré en effet, « *que l'activité de la surface dépend de l'arrangement et de l'espace-ment des atomes formant la couche superficielle. Le chauffage à 80° C pourrait produire un gonflement des plastides et par suite une modification de la couche superficielle entraînant une variation de l'activité de surface. S'il y avait gonflement, il y aurait augmentation de volume du précipité et par suite diminution de la vitesse de floculation* ».

L'étude des variations de volume que M. le Professeur LASSEUR commença avec Mlle ZAHL, fut continuée en collaboration avec M. MOREL et moi, question que nous reprîmes, M. LASSEUR, M. OLIVIER et moi dans des recherches ultérieures.

Je résumerai tout d'abord les deux séries de conclusions auxquelles nous sommes déjà arrivés.

A. — Dans l'agglutination par les ions H^+ , nous constatons que :

1) la précipitation instantanée s'accompagne d'une diminution de volume des plastides ;

2) pour les concentrations plus faibles en ions H^+ , la contraction croît jusqu'à une certaine limite avec la concentration en ions H^+ . Cette remarque est conforme aux observations de LOEB. Pour ce savant le gonflement est minimum au point isoélectrique et la différence de potentiel croît avec la concentration en ions H^+ jusqu'à une certaine concentration à partir de laquelle elle décroît.

B. — Avec l'agglutination sérique les résultats sont beaucoup plus difficiles à interpréter, car on obtient tantôt une augmentation, tantôt une diminution de volume. Il est à remarquer que ces variations de volume ne s'observent que pour des zones de fortes concentrations en sérum.

Le gonflement d'une plastide est la somme des gonflements individuels

des particules colloïdales qui la constituent. Or, une plastide est un système très complexe et rien ne prouve que tous ses constituants granulaires puissent se comporter de la même façon. Il ne faut donc pas être trop surpris de la diversité apparente des résultats obtenus.

NOUVELLES RECHERCHES

Technique. — Les plastides sont ajoutées aux solutions tampons dans la proportion de 4 cm³ de suspension microbienne pour 6 cm³ de solution tampon de pH variables. Ce mélange effectué, on ajoute dix centimètres cubes de sérum dilué, on réalise la répartition uniforme du sérum par aspirations répétées à l'aide de pipettes stériles.

Dans les expériences effectuées sur les plastides non additionnées de sérum, la composition du système est la suivante: 4 cm³ suspension microbienne + 6 cm³ solution tampon + 10 cm³ d'eau physiologique ou d'eau distillée.

Quel que soit le protocole adopté, le mélange (corps microbiens + solution tampon + sérum ou corps microbiens + solution tampon + eau) ainsi obtenu est immédiatement distribué dans des tubes à centrifuger gradués à la dose de 5 cm³. Après un temps de contact de 4 heures à la température du Laboratoire, on procède à la centrifugation des mélanges durant 15 minutes.

Nous ne pouvions pas mesurer le volume des corps microbiens pour toutes les dilutions de sérum variant du 1/100 au 1/64000, d'ailleurs les concentrations extrêmes offrent des complications. Avec les fortes concentrations les protéines du sérum peuvent jouer un rôle trop important, et avec les grandes dilutions, l'intensité d'agglutination est trop faible. C'est pourquoi nous avons fait porter nos essais sur des concentrations de l'ordre du 1/2000 ou du 1/1000 suivant l'activité du sérum mis en œuvre.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

1^{re} série (concentration des systèmes en électrolytes: 12 gr. à 14 gr 700 o/oo.

Afin de définir la part qui revient à l'antigène et celle qui doit être attribuée à l'anticorps dans le gonflement du complexe *anticorps* — *antigène* sous l'action des ions H⁺, nous devons faire porter nos investigations non seulement sur le complexe *plastides* + *sérum homologue*, mais encore sur les plastides seules et sur les plastides additionnées de sérum normal.

Nous allons donc tout d'abord envisager les modifications de volume des plastides de *B. caryocaneus* sous l'action des ions H⁺.



Variation du volume (plastides seules, plastides additionnées de sérum normal, plastides additionnées de sérum homologue) en fonction du pH.

Figure 1

Variation de volume des plastides de B. caryocyaneus en fonction des ions H^+ (fig. 1, courbe A).

Pour étudier ces variations de volume il semblerait plus logique de suivre le mode opératoire de LOEB, c'est-à-dire d'amener préalablement sérum et suspension au point isoélectrique. Ce procédé déterminerait des complications dans le phénomène que nous étudions, c'est la raison pour laquelle nous sommes partis de suspensions de $pH = 7$ ou voisin de 7: 6.90 dans l'expérience qui nous intéresse.

Lorsqu'on ajoute des concentrations croissantes en ions H^+ à une suspension de *B. caryocyaneus* de $pH = 6.90$, on observe une diminution de volume des plastides jusqu'à $pH = 3.6$. A partir de ce minimum, le volume croît jusqu'à $pH = 2.54$ (1).

Considérons la partie de la courbe A (fig. 1), de $pH = 7$ à $pH = 8.30$ et nous voyons que le volume décroît à mesure que diminue la concentration en ions H^+ .

En résumé, nous observons un maximum de gonflement pour un pH voisin de 7 et un minimum de volume pour un pH voisin de 3,6.

Si nous comparons la courbe A aux nombreuses courbes de gonflement des protéines obtenues par LOEB nous constatons que (pour les concentrations en ions H^+ inférieures au point isoélectrique), les Bactéries montrent un minimum de volume alors que la gélatine offre son maximum de gonflement (à $pH = 3.2$).

Ce renversement de la courbe s'explique dans nos expériences, par la complexité de la particule dispersée. Avec les microorganismes, nous devons tout d'abord tenir compte de la perméabilité de la membrane. De plus, les corps microbiens ne renferment pas que des protéines.

Par contre, pour la zone des concentrations comprises entre $pH = 7$ et $pH = 8.30$, on n'observe pas entre cette portion de la courbe A et les courbes obtenues par LOEB des différences aussi grandes que celles que nous venons d'indiquer pour la partie de la courbe qui représente le phénomène du côté acide à partir du point isoélectrique.

Quelles que soient les causes qui déterminent ces divergences dans l'action des ions H^+ sur les protéines et l'action des ions H^+ sur les corps microbiens, deux faits restent acquis: les plastides présentent un minimum de volume pour un pH voisin de 3,6 et un maximum de gonflement pour un pH de l'ordre de 7.

(1) Pour le but que nous poursuivions, il n'était pas indispensable d'opérer dans des zones de concentrations plus élevées en ions H^+ .

Variation de volume des plastides de B. caryocyaneus additionnées de sérums d'animaux non préparés.

I. — Sérum frais de Cobaye dilué au 1/200 (Courbe B).

En comparant les courbes A (plastides seules) et B (plastides + sérum de Cobaye), nous constatons que ces deux courbes ont sensiblement la même allure jusqu'à $\text{pH} = 7$. La courbe B présente un minimum de volume pour $\text{pH} = 3,4$; mais à partir de $\text{pH} = 7$, la branche descendante de la courbe A devient une branche ascendante dans la courbe B. Par conséquent, jusqu'à $\text{pH} = 7$, ce sont les variations de volume des plastides qui impriment leur caractère à la marche du phénomène.

La branche ascendante de la courbe B pourrait peut-être être imputée au sérum, cette conclusion semble être confirmée par l'examen de la courbe C.

2. — Sérum de Lapin chauffé et dilué au 1/200 (courbe C).

Les plastides de *B. caryocyaneus* additionnées de sérum de Lapin normal, mais chauffé (30 minutes à 56°C.) offrent un minimum de volume à $\text{pH} = 3,6$, un maximum de gonflement à $\text{pH} = 6$, puis le volume décroît jusqu'aux environs de $\text{pH} = 7$ pour croître à nouveau à partir de $\text{pH} = 7$. Dans la courbe C, nous retrouvons l'allure générale de la courbe A avec un décalage du maximum; mais on constate comme pour la courbe B, un accroissement de volume à partir de $\text{pH} = 7$ qui paraît dû, lui aussi à l'action du sérum.

Dans ces trois séries d'expériences, les plastides offrent un minimum de volume pour un pH de l'ordre de 3,4 — 3,6.

La réaction de *B. caryocyaneus* aux agents que nous venons d'étudier aurait pu constituer une anomalie, nous avons recherché l'influence du pH sur le volume des plastides d'un autre germe hautement agglutinable *B. prodigiosus*. La courbe D de la figure 1 représente l'allure du phénomène sur les plastides de *B. prodigiosus*. Nous pouvons constater que cette courbe est assez comparable aux précédentes.

Variation de volume du complexe anticorps-antigène sous l'action des ions H^{+} .

1. — Complexe anticorps-antigène-*B. caryocyaneus* (courbes E_1 E_2).

Nous envisagerons tout d'abord le complexe anticorps-antigène *B. caryocyaneus*. Les courbes E_1 et E_2 se rapportent à deux systèmes où le sérum est dilué respectivement au 1/500 (courbe E_1) et au 1/2000 (courbe E_2).

De $\text{pH} = 2,5$ à $\text{pH} = 7$, les courbes E_1 , E_2 ne diffèrent pas sensiblement des courbes que nous venons d'étudier; en effet pour E_1 et E_2 on observe

un minimum de volume dans la région des pH de l'ordre de 3,4 — 3,5. Le volume croît de pH = 3,4. — 3,5 à pH = 2,5. Il en est de même de pH = 3,4 — 3,5. à pH = 7. A partir de pH = 7 nous retrouvons une branche ascendante comme avec les courbes B, C, D. Le gonflement atteint son maximum à pH = 8,36, puis le volume décroît.

2. — Complexe anticorps-antigène-*B. chlororaphis* (courbe F).

La courbe F ne diffère pas essentiellement des courbes E₁ et E₂; le minimum de volume est bien au voisinage de pH = 3, mais l'accroissement du gonflement s'effectue plus rapidement qu'avec *B. caryocyaneus*.

2^e série (concentration des systèmes en électrolytes : 5 gr. 700 à 8 gr. 400 o/oo).

Dans cette seconde série d'expériences nous nous sommes efforcés de diminuer considérablement la concentration des systèmes en électrolytes afin de nous rapprocher autant que possible des concentrations utilisées par les bactériologistes. Les faits observés dans cette 2^e série d'essais sont superposables à ceux que nous venons de décrire.

Les résultats de ces deux séries d'expériences peuvent être schématisés de la façon suivante :

1^o Dans tous les cas, le gonflement croît de pH = 3 — 3,6 à pH = 2.

2^o Il offre un minimum entre pH = 3 et pH = 3,6.

3^o Le volume croît de pH = 3 — 3,6 à pH = 6 ou 7.

Ces faits sont d'ordre général.

Si nous ne retrouvons pas l'allure générale des courbes obtenues par LOEB, cela tient peut-être d'une part au comportement spécial des plastides bactériennes vis-à-vis des ions H⁺ et OH[—] et d'autre part, à la nécessité de recourir, pour élargir l'échelle des pH sur lesquels nous avons fait porter nos observations, à des solutions tampons de compositions différentes.

Ce sont là en effet, deux complications auxquelles nous nous sommes heurtés dans l'étude du gonflement des plastides microbiennes.

PREMIÈRE COMPLICATION. — VARIATION DE L'OPACITÉ DES SUSPENSIONS BACTÉRIENNES EN FONCTION DE LA TENEUR EN IONS H⁺.

Lorsqu'on additionne des suspensions bactériennes de doses croissantes d'ions H⁺ on constate, au bout d'un certain temps de contact, une modification considérable de l'opacité des suspensions. Les suspensions dont le pH est supérieur à 7 offrent une opacité beaucoup plus faible que les suspensions de pH variant de 5 à 2. Ce n'est là qu'une grossière approximation; un examen plus approfondi montre que la marche du phénomène est plus complexe. On peut s'en rendre compte en mesurant l'absorption de

ces différentes suspensions. A cet effet, des suspensions microbiennes préparées suivant la technique habituelle sont ajoutées aux solutions tampons de pH croissant. Après 4 heures de séjour à 37° C., on procède aux mesures photométriques. Il est nécessaire d'abandonner les suspensions un certain temps à l'étuve, car si pour $\text{pH} = 12$ par exemple, la modification est instantanée, pour la zone des fortes concentrations en ions H^+ , la variation d'opacité ne s'observe qu'après un certain laps de temps.

Les mesures ont été faites à l'aide du photomètre graduel de ZEISS, l'éclairage étant réalisé par la lampe STUPHO. Les suspensions ont été examinées sous une épaisseur de 20 millimètres.

La marche du phénomène observé avec *B. caryocyaneus* est schématisée dans la figure 2. En abscisse sont portés les pH et en ordonnée, l'absorption en pour cent :

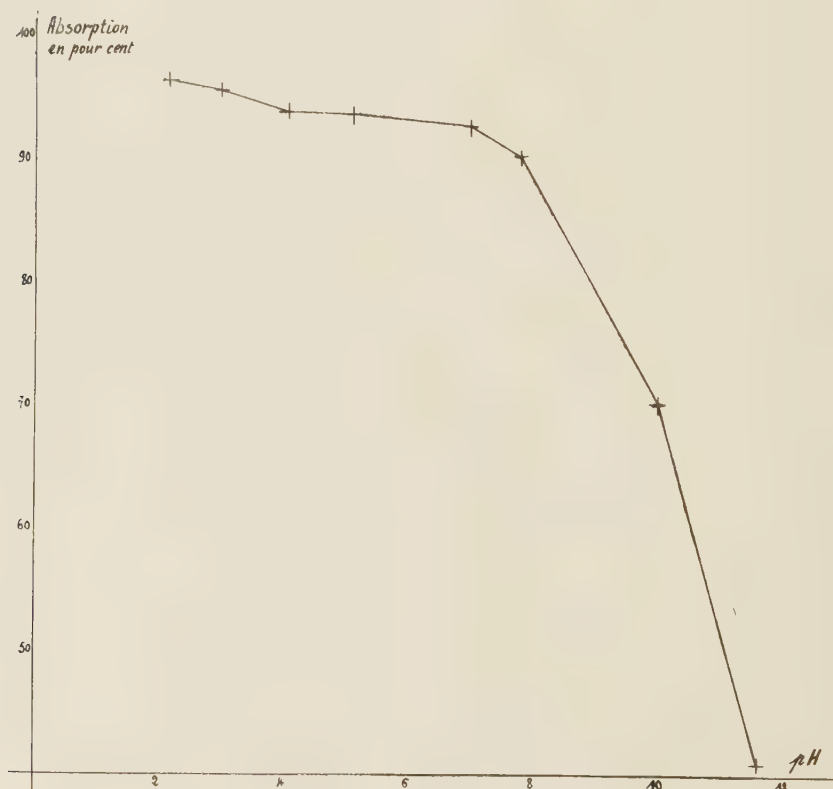


Fig. 2. — Variation de l'absorption des suspensions de *B. caryocyaneus* en fonction du pH.

L'examen de cette courbe montre que, de $\text{pH} = 2$ à $\text{pH} = 11,90$ l'absorption décroît à mesure que croît la concentration en ions OH^- . La diminution du trouble des suspensions est surtout importante de $\text{pH} = 7$ à $\text{pH} = 12$. Ce fait est imputable à l'hydratation et à la peptisation des plastides qui impriment leur cachet à la réaction et déterminent ainsi une chute rapide de l'absorption. L'hydratation, pratiquement instantanée, se traduit par un éclaircissement des suspensions qui peut être poussé jusqu'à la limpidité du système.

Il faut remarquer que la courbe présente une légère inflexion à $\text{pH} = 4,04$. À ce propos, je rappellerai que dans des expériences antérieures, faites en collaboration avec Ph. LASSEUR et OLIVIER (1931), sur les suspensions de *B. chlororaphis*, la courbe schématisant le phénomène présente deux parties distinctes et offre un point singulier à $\text{pH} = 4,85$.

Avec *B. chlororaphis*, l'absorption croît de $\text{pH} = 4,85$ à $\text{pH} = 3,5$ où elle offre un maximum à partir duquel elle décroît. Dans la zone des pH allant de $\text{pH} = 4,85$ à $\text{pH} = 12$, on note une chute très brusque de l'absorption.

DEUXIÈME COMPLICATION.

Il y a peut-être lieu d'envisager une autre cause d'erreur lorsqu'on étudie le gonflement des plastides microbiennes du côté alcalin du point isoélectrique.

Les solutions de Mc ILVAINE en effet ne permettent pas de dépasser $\text{pH} = 8$. Pour atteindre des pH plus élevés, il faut recourir aux solutions tampons de CLARK et LUBS (1916) (acide borique, chlorure de potassium, soude) et à celles de RINGER (phosphate disodique et soude). Or, il n'est pas certain que la nature de l'anion ne puisse pas jouer un rôle dans le gonflement des Bactéries. Pour déterminer l'importance de cette cause d'erreur, nous avons institué quelques recherches où nous avons fait varier la composition des solutions tampons pour un pH donné.

INFLUENCE DE LA COMPOSITION DE LA SOLUTION TAMPON

Dans ces essais nous avons employé les dix solutions tampons ci-dessous :

TABLEAU III

DÉSIGNATION DES SOLUTIONS TAMPONS		COMPOSITION DES SOLUTIONS TAMPONS
Type I	A.....	phosphate disodique et acide citrique.
	B.....	phosphate disodique et acide citrique.
	C.....	phosphate disodique et acide citrique.
Type II	D.....	citrate de soude et acide chlorhydrique.
	E.....	citrate de soude et acide chlorhydrique.
Type III	F.....	phthalate acide de potassium et acide chlorhydrique.
	G.....	phthalate acide de potassium et soude.
Type IV	H.....	acide acétique et acétate de soude.
Type V	I.....	phosphate monopotassique et soude.
Type VI	J.....	acide borique, chlorure de potassium et soude.

L'étude méthodique de l'influence de l'anion soulève deux grosses difficultés. Tout d'abord, on ne peut pas réaliser une série de pH variant de 1 à 12 avec une seule solution tampon, du moins avec les solutions habituellement utilisées. De plus, pour des raisons matérielles, l'expérimentation ne peut porter que sur une zone limitée de pH. Enfin on ne peut comparer entre eux que les résultats obtenus avec une même suspension initiale, c'est pourquoi nous avons choisi une zone de pH où l'action des ions H^+ était particulièrement importante lorsqu'on s'adressait aux solutions du type I. Nous étudierons, par exemple, comment se comporte le complexe anti-corps-antigène à $pH = 3,5$ et à $pH = 4,2$.

Nous avons schématisé dans le tableau suivant quelques-uns des résultats obtenus.

TABLEAU IV

Influence de la composition de la solution tampon sur le volume des plastides bactériennes.

DÉSIGNATION du complexe <i>anticorps-antigène</i>	VOLUME des plastides après centrifugation	pH DU LIQUIDE décanté après centrifugation	DÉSIGNATION des solutions tampons	
<i>B. caryocyaneus.</i>	augmentation de volume			
	0,11	3,50	A	} type I
	0,13	4,25	B	
	diminution de volume			
	0,12	3,50	D	} type II
	0,11	4,25	E	
	0,13	3,55	F	} type III
	0,105	4,30	G	
<i>B. chlororaphis..</i>	augmentation de volume			
	0,08	3,50	A	} type I
	0,09	4,27	B	
	0,08	3,54	D	} type II
	0,095	4,25	E	
	diminution de volume			
	0,11	3,50	F	} type III
	0,095	4,30	G	

L'examen du tableau IV montre que pour *B. caryocyaneus* les solutions du type II et III déterminent une diminution de volume au lieu de l'augmentation observée avec le type I.

Dans le cas de *B. chlororaphis*, on constate un accroissement de volume avec des solutions de type I et II, la solution III réalisant une diminution du gonflement.

Dans ces essais deux faits méritent de fixer l'attention :

I. — Deux espèces bactériennes peuvent réagir différemment vis-à-vis d'une même solution tampon (type II).

2. — Les solutions du type III déterminent un renversement de la courbe pour les deux germes expérimentés. Certes, avec deux points on ne peut pas se permettre d'extrapoler, mais on peut se demander si l'emploi de solutions tampons convenables ne permettrait pas d'obtenir, dans le gonflement du complexe anticorps-antigène en fonction du pH, une courbe analogue à celle que LOEB a observée dans le gonflement de certaines protéines. C'est à l'expérience qu'il appartiendra de préciser ce point particulier.

Les solutions tampons que nous avons utilisées ne sont pas rigoureusement comparables entre elles, en effet, pour un même pH (déterminé expérimentalement), elles renferment des quantités différentes d'électrolytes. Les solutions du type I par exemple offrent des teneurs en électrolytes qui varient suivant que l'on considère le pH = 3,5 ou le pH = 4,25 ou le pH = 7,49, etc... Si on compare la teneur en électrolytes des divers types de solutions tampons, on voit que pour un même pH la concentration est de l'ordre de 10 gr. par litre pour les solutions du type III et de 21 gr. par litre pour les solutions du type I.

Au premier abord on peut espérer expliquer les divergences observées avec les solutions du type I et du type III par leur teneur différente en électrolytes. L'étude un peu plus approfondie du phénomène montre qu'il ne faut pas attacher une trop grande importance à cette variable; en effet, les solutions du type II offrent des concentrations en électrolytes intermédiaires entre celles des solutions du type I et celles du type III. Or, les solutions du type II se comportent tantôt comme des solutions du type I, tantôt comme des solutions du type III.

Pour expliquer les différences d'action des solutions tampons, il ne semble pas non plus que l'on puisse faire intervenir la notion de concentration ions H^+ puisqu'il s'agit de pH déterminé expérimentalement.

D'ailleurs, LOEB a montré qu'au-dessous de certains pH: pH = 4,7, pH = 3, la plupart des acides di et tribasiques se dissocient comme des acides monobasiques.

Dans le gonflement du complexe *anticorps-antigène* sous l'action des ions H^+ , l'influence de la nature électrolytique de la solution tampon nous paraît incontestable. Si ces faits sont exacts, la marche générale de l'agglutination est vraisemblablement influencée, elle aussi, par la nature de ces solutions. Nous avons résumé dans les tableaux V et VI les résultats pour trois catégories de pH.

TABLEAU V

Antigène = *B. caryocyaneus*.

Anticorps = sérum *B. caryocyaneus*.

DÉSIGNATION de la solution tampon	pH DU SYSTÈME AGGLUTINANT	ASPECT DU SYSTÈME AGGLUTINANT
F	3.02	dépôt liquide clair
D	3.00	dépôt liquide clair
A	3.06	dépôt liquide clair
G	3.87	homogène
E	3.86	homogène
H	} 3.56 3.82	dépôt liquide clair
		homogène
B	3.95	homogène
I	7.14	dépôt liquide clair
J	7.14	dépôt liquide clair

TABLEAU VI

Antigène = *B. chlororaphis*.

Anticorps = sérum *B. chlororaphis*.

DÉSIGNATION de la solution tampon	pH DU SYSTÈME AGGLUTINANT	ASPECT DU SYSTÈME AGGLUTINANT
F	3.04	homogène
D	3.04	homogène
A	3.06	homogène
G	3.82	homogène
E	3.9	dépôt liquide louche
B	4.00	dépôt flocons
I	7.15	dépôt liquide clair
J	7.2	dépôt liquide clair

Remarque. — Ce tableau résume les essais de plusieurs séries d'expériences faites à des dates différentes.

L'allure de l'agglutination de *B. caryocyaneus* (1) et de *B. chlororaphis* par leur sérum homologue est donc influencée par la nature électrolytique de la solution tampon. On observe des faits analogues dans l'agglutination de *B. prodigiosus* lorsque l'on emploie comme source d'ions H^+ , les solutions G, E et B.

En résumé les Bactéries étudiées ne se comportent pas toujours de la même façon vis-à-vis de toutes les solutions tampons expérimentées. De plus, les diverses solutions utilisées peuvent influencer différemment une même espèce bactérienne.

*
* *

Ces faits établis, revenons aux courbes de gonflement de la figure 1, nous constatons que la réserve que nous faisons en ce qui concerne le changement de solution tampon est parfaitement justifiée.

Voyons cependant quelles sont les conclusions que l'on peut tirer de cette longue expérimentation.

En comparant les différentes courbes on est frappé par la similitude que présentent les courbes quand on limite l'examen aux pH variant de 2 à 5, en d'autres termes lorsque l'on se place du côté acide du point isoélectrique.

Le gonflement décroît de $pH = 2$ à $pH = 3 - 3,6$, puis il augmente de $pH = 3 - 3,6$ à $pH = 5$. Si l'on veut bien se rappeler que toutes les propriétés des protéines peuvent être au minimum au point isoélectrique, on en déduit inversement que le minimum de volume correspond à un point isoélectrique.

Si les choses se passaient bien ainsi, nous aurions la D. P. de cataphores, la pression osmotique, la viscosité au minimum et le « poids efficace » au maximum, entre $pH = 3$ et $pH = 3,6$. Par suite c'est dans cette zone que nous devrions observer le maximum d'agglutination, si l'agglutination, au moins dans ses grandes lignes, est sous la dépendance de la différence de

(1) Dans une autre série d'essais, nous nous sommes efforcés de faire varier le pH des suspensions par l'addition de quantités convenables d' H^2SO^4 et de $NaOH$. Pour des pH de l'ordre de 2,37, *B. caryocyaneus*, en présence de doses croissantes de sérum variant du 1/100 au 1/64000, n'offre aucune trace d'agglutination. Par contre, dès que le pH atteint 5,58, la dilution limite d'agglutination dépasse le 1/64000. Il semble que l'agglutination offre son maximum d'intensité à $pH = 6,07$. Lorsque l'on atteint des pH de l'ordre de 10,79, on note un éclaircissement considérable des suspensions, certaines sont limpides et toutes présentent une grande viscosité. L'absence d'agglutination dans cette région est due à une stabilisation par les ions OH^- . Si ces derniers peuvent peptiser certains éléments bactériens, le plus grand nombre des plastides résiste, tout en subissant une hydratation importante.

potentiel de cataphorèse. Or, avec *B. caryocyaneus* et *B. chlororaphis* le maximum d'agglutination s'observe de $\text{pH} = 4,56$ à $\text{pH} = 5$, c'est-à-dire à un pH voisin du point isoélectrique des protéines.

On pourrait peut-être expliquer ces faits à la condition de ne pas oublier que l'antigène est représenté par un élément très complexe, la plastide bactérienne dans laquelle il faut considérer une masse cytoplasmique (mélange de systèmes colloïdaux) limitée par une membrane. Or, avec les Bactéries et les Champignons, la membrane ne peut pas être ramenée à un film, elle constitue une formation offrant des résistances très inégales à la pénétration des diverses substances, par suite, l'ionisation qui s'exerce directement ou indirectement n'intervient pas de la même façon sur l'antigène et sur l'anticorps.

Les forces qui maintiennent l'anticorps en solution peuvent être ramenées aux forces qui interviennent dans la solubilité ordinaire en tenant compte toutefois que l'anticorps doit former un film à la surface de l'antigène. Cette fixation peut entraîner une « *dénaturation* » de l'anticorps qui est vraisemblablement une protéine. De ce fait, les groupes qui s'orientent vers la solution peuvent être différents suivant que l'on considère l'anticorps seul ou le complexe anticorps-antigène.

Les forces qui maintiennent les plastides en suspension doivent probablement être ramenées en partie aux répulsions électrostatiques des couches électriques doubles qui entourent les plastides et en partie aux forces de cohésion, aux forces d'attraction capillaire qui tendent à réunir les plastides en suspension; le mouvement brownien, le mouvement vital, la viscosité et le gonflement intervenant secondairement dans ces processus.

Or, nous avons vu que le gonflement des plastides bactériennes et la variation de la viscosité des suspensions microbiennes, sous l'action des ions H^+ , diffèrent des phénomènes observés avec les solutions de protéines additionnées de quantités croissantes d'ions H^+ .

Facteurs de stabilité des suspensions microbiennes chauffées à 80° C.

Sous l'influence du chauffage à 80° C., un grand nombre de Bactéries perdent partiellement ou complètement la faculté d'être agglomérées, floculées ou précipitées par le sérum homologue. C'est ce qui semble résulter des travaux de nombreux auteurs français et étrangers: WIDAL et SICARD (1897); VAN DE VELDE (1897); EISENBERG et VOLK (1902); JOOS

(1903); KRAUS et JOACHIM (1904); Ch. NICOLLE (1904); SCHELLER (1904); PORGES (1905); JOBLING (1906); FRIEDBERGER et MORESCHI (1906); DREYER et BLAKE (1906); LASSEUR (1921); LASSEUR et VERNIER (1924); LASSEUR et NOBLAT (1928); LASSEUR et DUPAIX (1929); LASSEUR, MOREL et DUPAIX (1929); LASSEUR, DUPAIX et GROJEAN (1932).

Il est à remarquer que tous les germes ne réagissent pas de la même façon sous l'action du chauffage à 80° C. Ainsi, *B. caryocyaneus* porté à cette température reste complètement insensible à l'action de son sérum homologue, tandis que *B. chlororaphis* n'offre qu'une diminution, considérable il est vrai, de son agglutinabilité. Pour expliquer cette perte partielle ou totale d'agglutinabilité, on peut tout d'abord penser à une fixation déficitaire d'agglutinine et c'est ce qui semble découler des travaux de JOOS (1903), mais dans des expériences célèbres, EISENBERG et VOLK (1902), avaient montré que les Bactéries devenues inagglutinables par chauffage à 65° C. continuent à fixer l'agglutinine au même titre que les plastides non chauffées, fait confirmé d'ailleurs par LASSEUR et ses Collaborateurs (1921-1924-1928).

Peut-on imputer à l'hydrolyse ou au gonflement l'inagglutinabilité observée à 80° C.? A priori, la chose paraît peu probable, car différents auteurs [PORGES, JOBLING (1906), DREYER et BLAKE (1906)] ont fait réapparaître l'agglutinabilité du Bacille typhique et du Colibacille chauffés à 80° C. en portant à nouveau ces microorganismes non pas à 80° C., mais à 100° C. LASSEUR et NOBLAT (1928) ont montré qu'« *en ce qui concerne les Bactéries chromogènes, ce second chauffage est pratiquement sans action. Par contre un seul chauffage à 115° C. est moins préjudiciable à l'agglutinabilité qu'un chauffage à 80° C.* ».

L'ensemble des recherches effectuées par LASSEUR et ses Collaborateurs montre que : « *la première phase de l'agglutination, fixation de l'agglutinine, est possible avec les corps microbiens chauffés, mais la seconde phase, la précipitation ne peut se produire* ».

Une autre hypothèse est due à PORGES (1905). Cet auteur pense que l'inagglutinabilité est imputable à la présence de corps empêchants formés aux dépens de la protéine bactérienne.

Or, des expériences ingénieuses faites par LASSEUR et VERNIER (1924) établissent d'une façon indéniable que la non-précipitation des suspensions chauffées de *B. Le Monnier* n'est pas due à des corps solubles empêchants.

On observe des faits analogues avec *B. chlororaphis*, *B. prodigiosus* *B. balticus*.

En présence de ces faits, nous avons recherché (LASSEUR, DUPAIX et

GROJEAN, 1932), dans quelle mesure le chauffage à 80° C. pouvait affecter les paramètres qui interviennent dans l'agglutination des Bactéries, c'est-à-dire, la tension superficielle, la charge électrique, la viscosité. Ce sont ces recherches que je vais résumer.

On pourrait être tenté d'admettre chez les Bactéries l'existence de deux antigènes; l'un agglutinable et thermolabile, l'autre non agglutinable mais doué de pouvoir fixateur et thermostable.

Cette hypothèse toute gratuite n'est pas soutenable. En effet le chauffage à 100° C. diminue peu l'agglutinabilité des suspensions bactériennes qui deviennent néanmoins remarquablement stables par chauffage à 80° C.

D'ailleurs à l'avenir la présence d'antigène thermolabile et thermostable chez une même Bactérie ne pourra être affirmée que lorsqu'on aura établi la formule de constitution des antigènes précités. Il est possible que tous les antigènes soient thermolabiles, mais le pourcentage d'antigène décomposé par la chaleur varie avec les conditions d'expérience. Ce qui paraît donner quelque vraisemblance à cette manière de voir, ce sont d'une part les résultats obtenus par les auteurs américains en ce qui concerne les antigènes et d'autre part les formules de constitution des pigments bactériens établies par KÖGL et POSTOWSKY (1930), WREDE et HETTCHE (1929).

Prenons l'exemple de la xanthoraphine et de la chlororaphine dont nous connaissons bien maintenant la composition chimique. Le pigment est décomposé par la chaleur, mais cette décomposition n'atteint pas toujours 100 %, elle varie suivant les conditions d'expérience; si dans certains cas il persiste 15 à 20 % de pigment sans altération sensible, dans d'autres cas, 90 à 95 % reste inaltéré. On pourrait évidemment parler de pigment thermolabile et thermostable alors qu'en réalité il s'agit d'une même espèce chimique mélangée à une quantité variable de ses produits de décomposition.

Actuellement l'étude de l'antigène ne peut guère être abordée que par la voie si brillamment tracée par HEIDELBERGER, AVERY, KENDALL, GOEBEL, TILLET, MORGAN, SIA, NEILL.

A la lueur de ces récentes acquisitions de la science nous aurions adopté une méthode de travail calquée sur celle de l'Ecole américaine ou de l'Ecole allemande si nous avions désiré approfondir la connaissance de la nature de l'antigène.

En fait, nous nous plaçons à un point de vue très différent, car nous voulons seulement étudier les paramètres qui régissent le phénomène de l'agglutination sérique des Bactéries, qu'il s'agisse de plastides vivantes ou d'éléments bactériens tués par la chaleur.

RECHERCHES PERSONNELLES

TECHNIQUE.

Nous avons recherché dans quelle mesure le chauffage (à 80° C.) fait varier la tension superficielle, la charge électrique, la viscosité, le pH, le trouble (l'absorption) des suspensions bactériennes.

A) PRÉPARATION DES SUSPENSIONS

A cet effet, des corps microbiens provenant de cultures (sur gélose de pH = 7) âgées de 40 heures, ont été lavés 3 fois à l'eau bidistillée et mis en suspension dans l'un des liquides dispersifs suivants :

- 1) Eau bidistillée ;
- 2) Eau bidistillée additionnée de NaCl à la concentration de 0,200 gr. par litre ;
- 3) Eau physiologique.

L'eau physiologique par son excès d'électrolytes complique les déterminations de vitesse de transport des Bactéries, ce qui justifie l'emploi des solutions renfermant 0,200 gr. de NaCl par litre. Ces solutions offrent une richesse en électrolytes suffisante pour provoquer l'agglomération des plastides, en présence de sérum homologue.

Les suspensions-mères ainsi obtenues sont agitées avec des billes de verre, soumises à une centrifugation fractionnée et par dilution, amenées à une concentration convenable en corps microbiens (en général 4 milliards de germes au cm³).

B) CHAUFFAGE DES SUSPENSIONS

Les suspensions sont distribuées dans des tubes de verre résistant et divisées en deux lots, l'un est conservé à la température du Laboratoire, l'autre est soumis au chauffage à 80° C. durant 30 minutes dans un thermostat à double volant d'eau muni d'un thermorégulateur (au toluène et mercure) de BARBAUDY, pour le chauffage au gaz (la figure 1, p. 73 représente l'appareil ouvert).

C) DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES

1) *Tension superficielle.* — Les mesures de tension superficielle ont été effectuées à l'aide de l'appareil de LECOMTE DU NOUY. Je me suis conformée strictement aux prescriptions de l'auteur.

2) *Transport électrique*. — Nous avons utilisé tantôt la méthode microscopique, tantôt la méthode macroscopique. Les résultats les plus constants nous ont été fournis par la méthode microscopique.

3) *Conductibilité spécifique*. — Pour la détermination de cette grandeur, nous avons adopté le dispositif classique de KOHLRAUSCH, mais à la lecture au téléphone nous avons substitué la lecture au haut-parleur.

4) *Viscosité*. — La viscosité a été mesurée à l'aide du viscomètre de LECOMTE DU NOUY (1931).

5) *pH*. — La concentration en ions H^+ a été déterminée par la méthode électrométrique mentionnée antérieurement.

6) *Absorption*. — Les mesures ont été effectuées à l'aide du photomètre graduel de ZEISS.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Les résultats obtenus sont résumés dans les tableaux suivants :

TABLEAU VII

B. caryocyanus.

NATURE des systèmes	TENSION superficielle en dynes/cm. à 25° C.	DIFFERENCE de potentiel exprimée en millivolts à 25° C.	VISCOSITÉ spécifique à 36° C.	Conductibilité spécifique à 25° C.	pH	ABSORPTION en pour cent
Suspension dans l'eau bidistillée	chauffée ...	61,8	—	—	—	—
	non chauffée ...	27,4	1,050	75 · 10 ⁻⁶	5,15	95,25
Suspension dans l'eau bidistillée + 0,200 o/oo NaCl	chauffée ...	75,6	1,035	39 · 10 ⁻⁶	4,33	93,
	non chauffée ...	36,5	1,107	434 · 10 ⁻⁶	5,27	90,2
Suspension dans l'eau physiologique	chauffée ...	70,6	1,035	404 · 10 ⁻⁶	4,85	94,
	non chauffée ...	56,	1,142	—	5,46	87,
		66,	1,035	—	4,85	93,5

Remarque. — Dans d'autres expériences nous avons obtenu pour les pH les valeurs suivantes :

Suspension — eau distillée, chauffée, pH = 6,30 et pH = 5,97
 — eau distillée, non chauffée, pH = 5,89 et pH = 5,52.
 — eau physiologique, chauffée, pH = 5,70 et pH = 5,84
 — eau physiologique, non chauffée, pH = 5,60 et pH = 5,77.

TABLEAU VIII

B. caryocyanus.

Nature des systèmes			Tension superficielle en dynes/cm. à 25° C.		Différence de potentiel exprimée en millivolts	
			Exp. A	Exp. B.	Exp. A	Exp. B.
Suspension dans l'eau bidistillée	chauffée ...	58,8	60,7	36,5	54,6	
	non chauffée ...	75,3	72,1	21,93	43,87	
Suspension dans l'eau bidistillée + 0 gr. 200 0/00 NaCl	chauffée ...	58,5	60,5	36,5	73,	
	non chauffée ...	75,3	70,6	24,37	24,37	

L'examen des tableaux VII et VIII montre que dans tous les cas, le chauffage à 80° C. provoque une chute importante de la tension superficielle (1) et une augmentation corrélative de la charge électrique. On note en outre un accroissement de la viscosité spécifique.

Examinons maintenant avec un peu plus de détails la variation de ces paramètres. Nous voyons que le chauffage détermine un abaissement de tension superficielle qui peut atteindre 10 à 17 dynes/cm.

On trouve donc déjà dans l'abaissement de tension superficielle, un facteur de stabilité des suspensions de *B. caryocyanus* chauffées à 80° C., à la condition, bien entendu, que la D. P. ne soit pas trop abaissée. Or, le chauffage fait croître la D. P. et dans certains cas, l'augmentation est considérable puisque celle-ci peut passer de 24, 37 à 73 mlvt. Avec d'autres germes, l'augmentation de la D. P. des plastides chauffées à 80° C. ne fait jamais défaut, mais elle est plus faible que dans l'exemple de *B. caryocyanus*.

De même, le chauffage à 80° C. augmente la viscosité des suspensions.

Nous trouvons donc là un ensemble de faits qui expliquent fort bien la stabilité des suspensions bactériennes chauffées si on admet que cette

(1) Dans son étude classique sur les « *Equilibres superficiels des solutions colloïdales* », LECOMTE DU NOUY (1929) signale (p. 51) l'abaissement de tension superficielle de deux solutions colloïdales par chauffage à 100° C. Dans ces essais, la chute de la tension superficielle est de l'ordre de 7 dynes.

stabilité est sous la dépendance de la charge électrique, de la tension superficielle et de la viscosité, puisque le chauffage a fait varier les trois paramètres dans le sens de la stabilisation des suspensions. Cependant les variations observées ne seraient peut-être pas suffisantes pour expliquer l'ensemble des phénomènes. On est ainsi conduit à étudier d'autres facteurs d'action: tout d'abord le pH, puis la variation du trouble des suspensions, qui peut être imputable, au moins pour une partie, à l'hydratation.

Nous avons fait figurer dans les tableaux un certain nombre de valeurs du pH; or, le pH des suspensions augmente toujours par chauffage à 80° C., mais il reste dans la zone des pH éminemment favorables à l'agglutination sérique des Bactéries.

Le tableau VII peut être considéré à un autre point de vue: celui de la variation de l'absorption des suspensions bactériennes sous l'action du chauffage. Les variations du trouble des suspensions peuvent être imputables à plusieurs phénomènes: à un début d'agglutination, à une hydratation, à l'hydrolyse plus ou moins profonde ou à une peptisation.

LASSEUR a montré que, dans les suspensions bactériennes chauffées, les plastides ne sont pas toujours rigoureusement isolées, parfois les éléments bactériens sont réunis par 2, 3 ou 4. Quant aux phénomènes d'hydratation et d'hydrolyse, se compliquant ou non de la peptisation des plastides, il s'agit là de processus que l'on pense tout de suite à invoquer, et cela d'autant plus que le rôle de l'hydratation dans la stabilisation des colloïdes hydrophiles a été nettement précisé par KRUYT et DE JONG. C'est un point sur lequel BOUTARIC (1931) insiste assez longuement.

D'ailleurs, nous observerons cette action de l'hydratation dans l'influence des substances tensio-actives sur la marche du phénomène de CHARRIN et ROGER. Mais immédiatement une difficulté surgit. Lorsqu'on examine avec attention le tableau VII, on constate que l'action du chauffage se traduit de façon différente suivant que l'on utilise l'eau bidistillée ou bien l'eau bidistillée additionnée de chlorure de sodium. En présence de cet électrolyte (des quantités faibles suffisent: 0,200 gr. 0/00), le chauffage détermine une diminution très sensible du coefficient d'extinction, tandis qu'au contraire, en l'absence de chlorure de sodium, l'absorption croît avec le chauffage.

Nous retrouvons donc là des faits analogues à ceux que nous avons signalés antérieurement. Nous avons montré, en effet, que le trouble d'une suspension bactérienne effectuée dans l'eau bidistillée se modifie par apport de chlorure de sodium. L'hypothèse d'agglutination devant être écartée, la modification du trouble doit vraisemblablement s'expliquer par une varia-

tion de l'hydratation de la plastide, qui est évidemment fonction de la variation de perméabilité de la membrane.

Dans l'état actuel de l'expérimentation, il est impossible de tenter une explication de ces phénomènes.

CONCLUSIONS

La stabilité remarquable des suspensions bactériennes chauffées à 80° C. s'explique, au moins partiellement, par une diminution de la tension superficielle des systèmes dispersés; une augmentation de la charge électrique des plastides et un accroissement de la viscosité des suspensions.

CHAPTIRE III

VARIATION DE QUELQUES PARAMÈTRES AU COURS DE L'AGGLUTINATION SÉRIQUE DES BACTÉRIES

Généralités et Historique

Après avoir établi :

1) que l'agglutination des Bactéries (agglutination sérique, agglutination par les substances chimiques) a lieu bien avant le point isoélectrique,

2) que le pH joue un rôle important dans la marche de l'agglutination, nous allons nous efforcer de serrer de plus près la question en étudiant la variation simultanée de quelques paramètres au cours de l'agglutination.

Lorsque nous admettons que l'agglutination a lieu avant le point isoélectrique, nous arrivons à formuler des conclusions analogues à celles de NORTHROP (1924). Ce savant admet en effet l'existence d'une différence de potentiel (D. P.) critique au-dessous de laquelle les suspensions sont précipitées.

Dans les expériences de NORTHROP, l'agglutination sérique des Bactéries se produit lorsque la différence de potentiel (D. P.) est abaissée au-dessous de 15 millivolts (1).

M^{lle} E. SORU (1929) pense que l'agglutination de *B. tumefaciens* par les ions H⁺ s'effectue quand la différence de potentiel critique atteint 17.95 millivolts. Des nombres ci-dessus, nous ne retiendrons que l'ordre de grandeur. Il faut se garder des généralisations hâtives. En effet, dans nos essais, la différence de potentiel critique varie d'une expérience à l'autre. Ces variations s'observent notamment lorsqu'on mélange des corps microbiens provenant de différentes cultures d'une même espèce bactérienne avec des parties aliquotes A, B, C..., de leur sérum homologue. De ces faits, on peut rapprocher les belles expériences de NORTHROP (1921-1922) où la différence de potentiel ne suffit pas à expliquer le mécanisme de l'agglutination sérique des Bactéries. En 1921, LASSEUR avait déjà signalé

(1) Différence de potentiel critique : 30 mlvt. huile (Powis), 15 mlvt. collodion (Loeb).

des faits analogues et nos recherches ultérieures n'ont fait que confirmer cette première conclusion. Pour expliquer les faits ci-dessus, deux hypothèses peuvent être émises : 1° les déterminations de différence de potentiel sont entachées d'erreurs graves; ce qui n'est pas impossible; 2° nous négligeons un ou plusieurs facteurs d'action inconnus. Cette hypothèse, très vraisemblable, nous a conduits à l'étude de différents paramètres : tension superficielle, vitesse de transport, différence de potentiel, conductibilité, viscosité, pH, absorption.

Nous aurions dû, évidemment, mesurer la pression osmotique au sens de J. DUCLAUX (1920), puisque l'éminent biologiste français a montré que la stabilité des suspensions colloïdales est sous la dépendance de la pression osmotique. Malheureusement, la détermination de cette grandeur présente, dans nos conditions d'expériences, de grandes difficultés. C'est pourquoi nous nous sommes limités à la détermination de quelques paramètres, que nous compléterons plus tard par la détermination indirecte de la pression osmotique, c'est-à-dire le volume des corps microbiens.

Avant d'exposer ces nouvelles recherches nous résumerons très brièvement le rôle possible de la tension superficielle dans la coagulation des colloïdes et des suspensoïdes en général. Les Biologistes sont en effet autorisés à rechercher les facteurs de stabilité des suspensions parmi les paramètres qui régissent la précipitation des suspensions colloïdales; mais ainsi que nous l'avons fait remarquer antérieurement (1929, 1930, 1931) (1), les facteurs d'action qui régissent la précipitation des particules de l'ordre du μ n'interviennent pas de la même façon lorsque la phase dispersée est représentée par des éléments de l'ordre du μ .

En 1907, Victor HENRI et A. MAYER (2) lient la tension superficielle, la charge, et la viscosité dans la stabilisation des suspensions d'après le schéma suivant :

	Solutions colloïdales	
	Stables	Instables
Tension superficielle.....	faible	grande
Charge électrique.....	grande	faible
Viscosité	grande	faible

(1) Travaux du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy, fasc. IV, 1931, p. 142.

(2) In O. D. CHWOLSON, Traité de physique, Tome I, fascicule III, p. 738. Paris, Hermann, 1907.

En ce qui concerne la tension superficielle des granules, ces savants pensent qu'elle doit être très faible pour toute une série de solutions colloïdales « *ce que l'on peut déduire de ce fait que ces substances se gonflent très fortement dans l'eau* ». Quant à la viscosité du milieu, les solutions colloïdales « *sont d'autant plus stables que les granules se trouvent dans un milieu plus visqueux* ».

Cette même influence de la tension superficielle se retrouve dans la phrase suivante de MICHAELIS (1928): « *La stabilité d'une solution colloïdale est déterminée à tout moment par la tension superficielle entre la phase dispersée et le médium de dispersion. Une augmentation continue de tension doit conduire à la coagulation* » (1).

On sait que, dès 1888, VAN BEMMELEN faisait intervenir la tension de surface dans la précipitation des colloïdes, théorie qui fut développée ultérieurement par W. OSTWALD (1919).

Les recherches de TRAUBE (1891) ont montré que les substances qui abaissent la tension superficielle abaissent « *l'énergie superficielle libre* » de l'eau, elles impliquent ainsi une action de la tension superficielle sur la stabilité des colloïdes.

Sans préciser la nature des forces de cohésion, NORTHROP pose en principe qu'il y a coagulation chaque fois que la force d'attraction dépasse la force de répulsion. Mais la nature de la force d'attraction paraît beaucoup moins certaine à NORTHROP. « *La majorité des auteurs pensent qu'il y a une « tension superficielle », ou un effet « capillaire »* et BILLITZER (1905) suppose que la variation de potentiel est simplement la mesure de la variation de tension superficielle », celle-ci passant par un maximum quand la D. P. tend vers le minimum, phénomène si bien étudié par LIPPMANN dès 1874.

MICHAELIS (1914) a exprimé la même idée. V. SMOLUCHOWSKI (1916) pense aussi que la force d'attraction croît en raison inverse du potentiel. FREUNDLICH (1918) admet que la force d'attraction est constante.

TRAUBE pense qu'on peut attribuer en grande partie à leur forte tension superficielle la précipitation par les électrolytes des Bacilles, des ferments et des colloïdes.

VLÈS (1929) rappelle qu'un grand nombre d'auteurs ont invoqué le rôle

(1) In Robert-Hermann BOGUE, Traité de chimie colloïdale, T. I, p. 227, 1928.

de la tension superficielle dans la « *stabilisation* » ou l'« *instabilisation* » des solutions colloïdales ; mais l'éminent biologiste fait remarquer que les mesures qui ont été invoquées à l'appui de ces théories ont toujours été relatives à la tension superficielle liquide-air, propriété qui ne peut être reliée que d'une façon détournée « *aux phénomènes se passant à la surface d'un grain par rapport au liquide ambiant ou par rapport à un autre grain adjacent* » (p. 276). Aussi VLÈS accepte-t-il l'hypothèse de NORTHROP et de KRUIF c'est-à-dire l'existence de *forces de cohésion* sans toutefois préciser la nature de ces forces de cohésion.

KOPACZEWSKI (1930) rappelle que depuis les recherches de TRAUBE la tension superficielle doit être considérée comme étant un facteur de stabilité des colloïdes (p. 447). Pour KOPACZEWSKI, la floculation d'un colloïde s'accompagne « *après une élévation préalable, d'un abaissement de la tension superficielle, de telle sorte qu'au moment de la floculation totale la tension superficielle d'un mélange devient celle du solvant pur* ».

Après avoir rappelé ces généralités, nous relaterons quelques travaux ayant trait à l'agglutination des Bactéries.

Dans son étude sur les « *Conditions physico-chimiques de la vitalité microbienne* », KOPACZEWSKI (1923) s'exprime en ces termes : tous les microorganismes étudiés produisent dans leurs milieux de culture des modifications physiques. « *Ces modifications doivent nécessairement amener, soit l'agglutination des microorganismes (augmentation de la tension superficielle) et puis, par les changements de la perméabilité membraneuse (variations de la concentration en ions H⁺), une lyse consécutive, soit une lyse d'emblée (baisse de la tension superficielle)* » (p. 1.337). Le lecteur nous pardonnera si nous rappelons à nouveau les belles recherches de NORTHROP (1928) sur l'agglutination sérique du Bacille typhique. L'auteur pose en principe que l'agglutination des granules ou des plastides est la résultante des forces d'attraction et des forces de répulsion. Le savant américain s'est rendu compte que la notion de charge électrique est insuffisante pour expliquer tous les faits observés, aussi fait-il intervenir des forces de cohésion. Ces forces sont mesurées grossièrement dans une expérience classique qui consiste à barbouiller des lames de verre avec un enduit de corps bactériens. Les lames sont légèrement chauffées pour permettre aux plastides d'adhérer, puis les lames sont appliquées l'une contre l'autre par la face enduite de suspension bactérienne. Enfin une balance à torsion permet de déterminer la force nécessaire pour séparer les deux lames. NORTHROP a ainsi montré qu'il est

possible de provoquer l'agglutination des Bactéries par augmentation des forces de cohésion, entre les microorganismes, sans modification de la différence de potentiel. L'intérêt de cette observation ne saurait échapper au lecteur, mais il y a lieu de faire des réserves sur cette conclusion puisque les mesures de forces de cohésion n'ont été déterminées qu'avec une grossière approximation.

Eugénie SORU (1930) a mesuré la tension superficielle :

- 1° de suspensions de Vibrion cholérique ;
- 2° de suspensions de Vibrion cholérique additionnées de sérum normal ;
- 3° de suspensions de Vibrion cholérique additionnées de sérum antityphique ;
- 4° de suspensions de Vibrion cholérique additionnées de sérum anticholérique.

Dans ces expériences le sérum normal produit un léger abaissement de la tension superficielle, l'abaissement paraît plus fort avec le sérum antityphique, mais il est du même ordre de grandeur. Par contre le sérum anticholérique provoque une chute variable de la tension superficielle, mais beaucoup plus importante néanmoins que celle qui a été déterminée par les deux sérums précédents.

Dans leurs belles recherches relatives à l'influence des électrolytes sur l'agglutination des hématies J. FORSSMAN, Th. WADSTEIN et G FISCHER (1930) rappellent les travaux (de NEISSER, FRIEDMANN, BUXTON, NORTHRUP, SHIBLEY et HÖBER) qui ont conduit à la notion de forces de cohésion et de D. P. dans l'agglutination sérique des Bactéries. Sans mettre en doute la variation de la D. P. et des forces de cohésion au cours de l'agglutination les savants suédois font remarquer que des suspensions bactériennes peuvent rester homogènes bien qu'elles aient été amenées à leur point isoélectrique. Il faut donc admettre qu'il y a eu, par un processus inconnu, neutralisation des forces de cohésion. En d'autres termes FORSSMAN et ses Collaborateurs sont eux aussi conduits à supposer l'existence de paramètres autres que la D. P. et les forces de cohésion.

Recherches personnelles

TECHNIQUE.

SÉRUM. — CONCENTRATION EN ÉLECTROLYTES.

LASSEUR, 1928, LASSEUR et FRIBOURG, 1928 ont montré que des concentrations élevées en électrolytes gênent la détermination de la vitesse de transport des plastides, mais on sait aussi que l'agglutination ne peut se produire qu'en présence d'une certaine quantité d'électrolytes (BORDET, 1899). Cette concentration est de l'ordre de 50, 100, 200 milligrammes par litre (LASSEUR, 1921, LASSEUR et NOBLAT, 1928). La quantité d'électrolytes nécessaire est d'autant plus grande que l'on utilise un plus petit nombre d'unités d'agglutinine, ce qui est réalisé soit en employant des sérums de moins en moins agglutinants, soit en expérimentant sur des dilutions de plus en plus grandes d'un sérum très riche en agglutinines.

Nous avons montré aussi dans des publications antérieures (LASSEUR, DUPAIX, OLIVIER, 1931) que les protéines du sérum peuvent stabiliser les suspensions bactériennes. C'est pour cela que nous avons toujours employé des sérums hautement agglutinants dont la dilution limite d'agglutination est de l'ordre du 1/100.000 lorsqu'on opère en milieu renfermant 9 gr. de chlorure de sodium par litre. En employant le sérum dilué au 1/1.000, nous pouvions espérer, même avec de faibles concentrations en électrolytes: 100, 200 milligrammes par litre, obtenir l'agglutination sérique des Bactéries avec formation de flocons, puis sédimentation des corps microbiens et éclaircissement complet des systèmes agglutinants. Avec les systèmes pauvres en électrolytes (concentration de 50, 100, 200 milligrammes) le sérum donne des dilutions limites d'agglutination qui sont inférieures à celles que l'on obtient avec les systèmes renfermant 9.000 milligrammes de chlorure de sodium par litre. C'est un point qu'il ne faut pas perdre de vue dans l'interprétation des tableaux qui figurent dans ce chapitre.

Nous avons utilisé du sérum de Lapin préparé avec *B. caryocyanus*; tous les essais d'agglutination ont été effectués avec des plastides de *B. caryocyanus*. Ce germe donne des suspensions constituées par des plastides isolées et résistant longtemps à la sédimentation. Les suspensions proviennent de cultures sur gélose-peptone de pH = 7, âgées de 40 heures. Les corps microbiens ont été lavés 3 fois à l'eau contenant 50 milli-

grammes de chlorure de sodium par litre. Par agitation avec des billes de verre et centrifugation fractionnée, on obtient finalement une suspension-mère qui, par dilution, est amenée à la concentration de 8 milliards de germes au cm^3 .

DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES.

Tension superficielle. — La tension superficielle statique a été déterminée à l'aide du tensiomètre de LECOMTE du NOUY. Les concentrations en électrolytes et en sérum étant réalisées pour que l'agglutination se traduise par un très fin précipité, les mesures de tension superficielle n'offrent pas de bien grandes difficultés; cependant, malgré les précautions prises, la détermination de la tension superficielle comporte certaines causes d'erreur. Toutes les mesures ont été effectuées à la température de 22°C .

Les appareils à tubes capillaires ne sauraient être employés dans les mesures effectuées sur des suspensions totalement précipitées. *B. caryocyaneus*, avons-nous dit, donne des suspensions stables, du moins pendant la durée des opérations, c'est ce qui permet de faire des mesures successives jusqu'à l'obtention de valeurs sensiblement constantes. Avec les germes qui se sédimentent facilement, on observe les faits signalés par Mlle SORU: au fur et à mesure que les plastides se sédimentent, la tension superficielle à la surface de séparation air-eau augmente pour tendre vers la tension superficielle du liquide dispersif. Il est bien évident que l'on n'a pas affaire à de l'eau pure, mais à de l'eau renfermant des électrolytes. Cette augmentation de tension superficielle est sensible lorsqu'on opère avec des plastides qui se sédimentent rapidement ou avec de grosses cellules telles que celles des Champignons et elle devient très importante lorsqu'on s'adresse à une suspension bactérienne en voie de précipitation sous l'action de son sérum homologue (Expérience B I et B II).

Par contre les suspensions de *B. caryocyaneus* non additionnées de sérum offrent une tension superficielle constante (expériences A et C) si la durée de l'examen est de l'ordre de 30 à 60 minutes.

Enfin dans d'autres systèmes, notamment en présence de substances tensio-actives (expériences D et E), la tension superficielle a légèrement baissé jusqu'à une valeur qui s'est ensuite maintenue constante.

Expérience A

Suspension + sérum dilué
au 1/1000
Concentration en NaCl : 50 mmgr. 0/00
Tension superficielle mesurée
immédiatement après
le mélange
exprimée en dynes/cm.

74,2

74,1

74

74

Expérience B

Suspension + sérum dilué
au 1/1000
Concentration en NaCl : 50 mmgr. 0/00
Tension superficielle mesurée
30 minutes après
le mélange
exprimée en dynes/cm.

I

II

62,8

66

69,2

66,7

70,7

66,8

71,7

67,8

71,7

68,6

69,2

69,9

69,9

Expérience C

Suspension dans l'eau distillée additionnée de NaCl : 50 mmgr. 0/00
Tension superficielle exprimée en dynes-cm.

I

II

76

75,8

76

75,9

76

75,9

76

75,9

75,9

Expérience D

Suspension + taurocholate de soude :
500 mmgr. %
Concentration en NaCl :
9000 mmgr. o/oo
Tension superficielle
exprimée en dynes/cm.

—
35,5
35,5
35,2
34,9
34,9

Expérience E

Suspension + glycocholate 500 mmgr. %
+ sérum (dilution 1/200)
Concentration en NaCl :
9000 mmgr. o/oo
Tension superficielle
exprimée en dynes/cm.

Suspension + glycocholate 125 mmgr. %
+ sérum (dilution 1/200)
Concentration en NaCl :
9000 mmgr. o/oo
Tension superficielle
exprimée en dynes/cm.

—
39,3
38,9
38,5
38,5
38,1
38
38

—
47,5
47
46
44,6
44,4
44,4

Dans les tableaux qui vont suivre, nous avons essayé de mesurer la tension superficielle après des temps de contact différents, nous avons fait figurer le temps zéro. Il est bien évident que l'on ne peut pas déterminer la valeur de la tension superficielle statique au bout du temps 0, puisque cette détermination exige une série de mesures. Il n'en serait pas de même en ce qui concerne la tension superficielle dynamique. Sous la rubrique de *t* zéro, nous avons voulu dire que la série de mesures qui doit donner la grandeur cherchée a commencé aussitôt le mélange effectué.

Différence de potentiel. — La vitesse de transport électrique a été déterminée par la méthode microscopique en nous conformant aux précautions indiquées par LASSEUR et ses Collaborateurs dans diverses publications du Laboratoire.

Nous avons mesuré la vitesse des différentes couches qui constituent la préparation. Le dispositif est celui de COTTON et MOUTON que nous avons réalisé de la façon suivante : sur une lame de verre épais mesurant 130^{mm} x 35^{mm}, on réalise une chambre (1) où est déposée la suspension à étudier. Des lames d'argent doré d'épaisseur convenable sur lesquelles sont soudées les bornes de connexion constituent les électrodes qui permettent de produire un champ électrostatique. La figure 1, de la Planche II nous dispense de plus longs détails.

(1) Nous avons fait établir par la Maison ZEISS une série de chambres de profondeur variant de 0,15 mm. à 0,45 mm.

Dans nos expériences précédentes, nous avons éprouvé de grosses difficultés à réaliser synchroniquement la fermeture du circuit et la mise en marche du chronomètre. La même difficulté se retrouvait à la fin de l'expérience lorsqu'il fallait couper le circuit et immobiliser l'aiguille du chronomètre. Grâce à l'habileté technique de M. JACQUOT, nous avons pu effectuer simultanément ces deux opérations, à l'aide d'une clef Morse munie d'un levier ainsi qu'on peut s'en rendre compte par l'examen de la figure 1.

En pratique on a toujours intérêt à suivre une plastide qui se trouve à la limite du champ microscopique, mais encore faut-il s'assurer que cette plastide se déplace facilement. Aussi, est-on conduit à établir des contacts rapides en F à l'aide d'une pièce métallique quelconque sans appuyer sur le bouton G, c'est-à-dire sans déclencher le chronomètre. C'est après s'être bien assuré de la mobilité de la plastide dont on veut déterminer la vitesse de transport que l'on appuie sur le bouton G. Il ne faut pas oublier, en effet, que certaines plastides peuvent être immobilisées par des causes diverses.

Dans les tableaux IX, X, XI, XII, nous faisons figurer la différence de potentiel calculée d'après la formule :

$$V = \frac{4 \pi}{K} \frac{\eta v}{x}$$

V = différence de potentiel entre la particule et l'eau en contact.

K = constante diélectrique de la couche superficielle.

η = viscosité.

v = vitesse en centimètres par seconde.

x = gradient de potentiel.

LEWIS fait K égal à la constante diélectrique de l'eau, η = la viscosité de l'eau, v = la vitesse des particules en centimètres par seconde sous un gradient de différence de potentiel de X volts par centimètre.

On sait que cette équation devrait s'écrire :

$$V \frac{l}{d} = \frac{4 \pi}{K} \frac{\eta v}{x}$$

PLANCHE II.

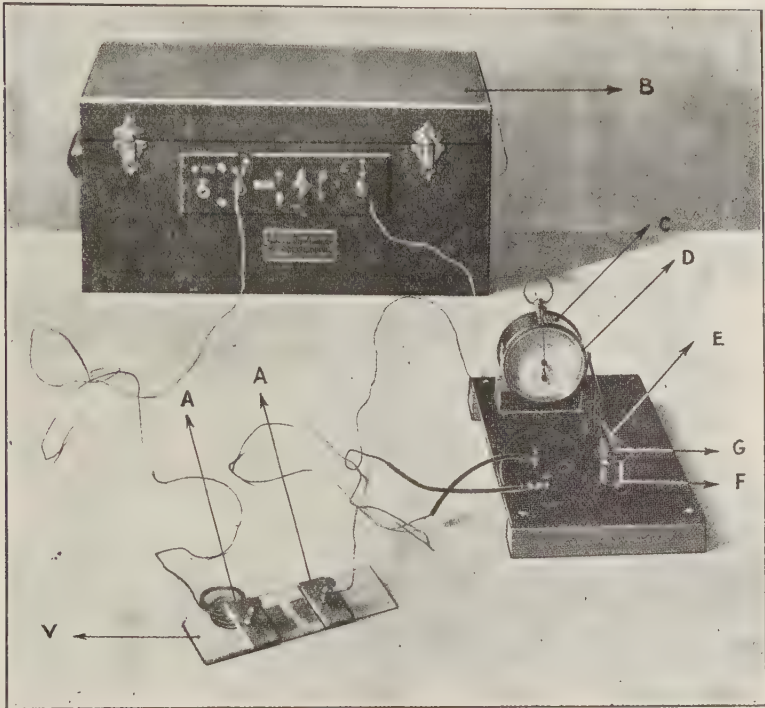


Fig. I. — A: lame d'argent doré pouvant coulisser sur la lame de verre; B: accumulateur; C: chronomètre; D, levier de mise en marche du chronomètre; E: clef-Morse; F: contact; G: bouton de la clef-Morse; V: lame de verre.

Or LAMB considère l et d comme étant du même ordre de grandeur (10^{-8} cm.).

BURTON (1) pose $\frac{l}{d} = 1$ ce qui conduit à l'équation :

$$V = \frac{4 \pi}{K} \frac{\eta v}{x}$$

K est la constante diélectrique du milieu séparant les armatures, LIPP-MANN l'admet égale à 1. BURTON considère cette constante comme étant celle du milieu lui-même, dans le cas particulier ce serait celle de l'eau. NORTHROP la fait égale à 1, de même $\eta = 1$ ce qui conduit NORTHROP à la formule :

$$D. P. = 13 \frac{\mu \text{ par seconde}}{\text{volt par centimètre}} \text{ en millivolts.}$$

Nous ferons remarquer immédiatement qu'en ce qui concerne les Bactéries il s'agit là d'une détermination grossière, en effet, on sait que la viscosité augmente considérablement au moment de l'agglutination (2), qu'elle peut être, par exemple, quatre fois supérieure à celle de l'eau. De plus, si on peut comme HELMHOLTZ ne pas tenir compte du frottement de l'eau à la surface du verre lorsqu'il s'agit de transport macroscopique, il est évident que dans le cas de transport microscopique ce frottement peut atteindre une certaine valeur, et dans ce cas, la conception de LAMB est infiniment préférable. Enfin, les plastides de *B. caryocyanus* ne peuvent guère être assimilées à des sphères !

(1) d = distance entre les plaques d'un condensateur à air équivalent à celui virtuellement formé par les surfaces solide et liquide.

l = grandeur linéaire mesurant la facilité de glissement et égale à η/B .

η = coefficient de viscosité.

B = coefficient de frottement du liquide en contact avec les parois du tube.

(2) J. DUCLAUX (1920) montre que la viscosité augmente d'une façon extrêmement rapide au voisinage de la concentration maximum d'un sol de caséine. Cette concentration atteinte, le colloïde prend l'état solide. Nous avons donc, dans ce phénomène de coagulation, quelque chose d'analogue à l'augmentation de la viscosité dans les phénomènes d'agglutination.

Sous ces réserves, nous avons calculé les différences de potentiel afin de comparer les résultats obtenus avec ceux de nos devanciers.

Conductibilité électrique. — Tout le monde connaît l'importance du coefficient personnel dans les lectures au téléphone, surtout lorsqu'il s'agit de mesurer des résistances de l'ordre de 20.000 ohms à 100.000 ohms. Sur les conseils de M. PIERRET et grâce à la collaboration de M. JOINVILLE, nous avons substitué la lecture au haut-parleur à la lecture au téléphone à l'aide d'un amplificateur basse fréquence à 3 étages dont un étage push-pull (voir planche III).

Il est de toute nécessité d'utiliser, du moins en premier étage, une lampe non microphonique. Au lieu de choisir parmi les lampes du commerce celles qui sont le moins microphoniques on peut tout simplement s'adresser aux lampes dont le blindage moule le culot et qui sont d'un emploi courant dans les préamplificateurs utilisés en cinématographie sonore.

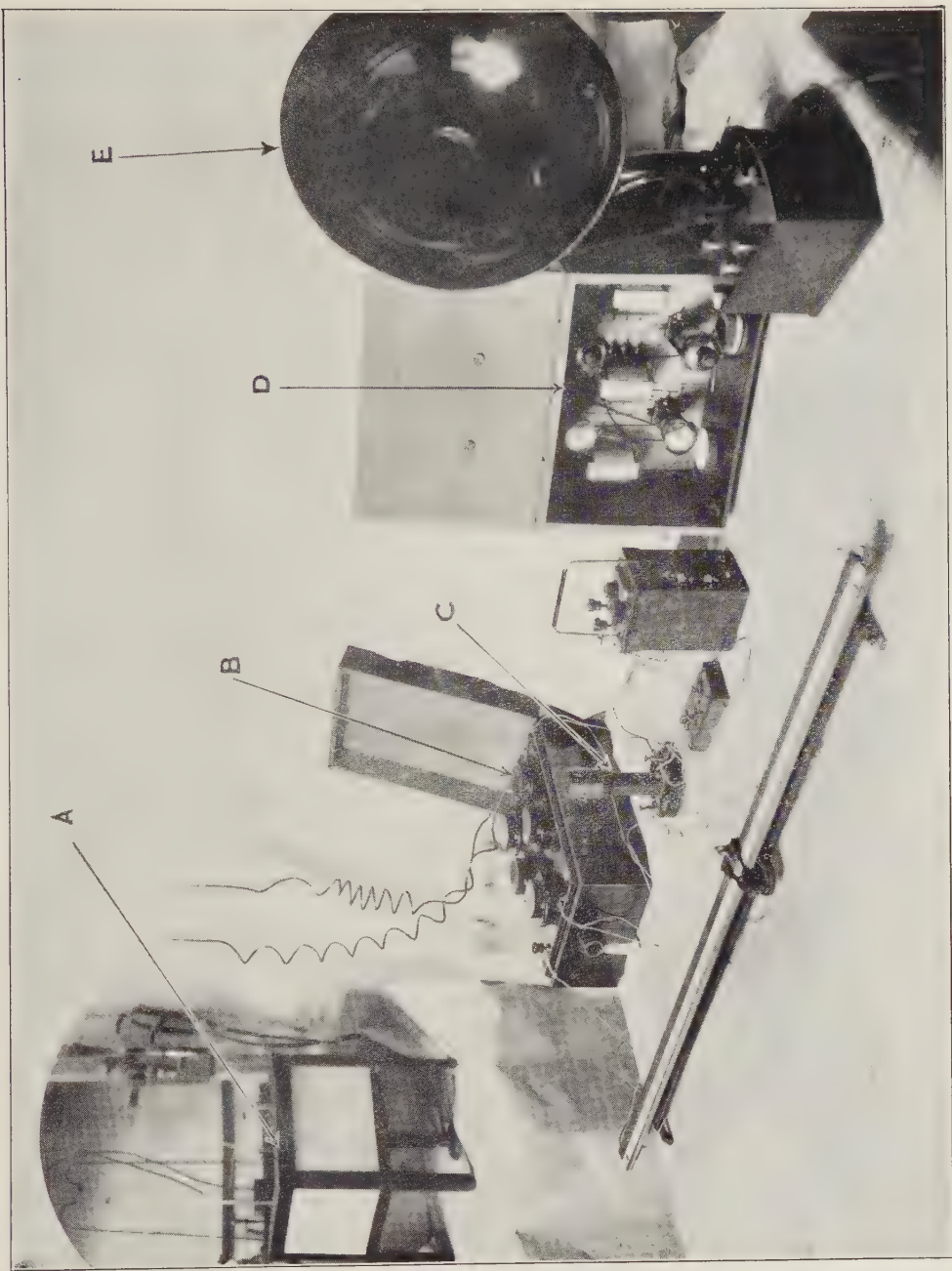
Les lampes doivent être chauffées sous 4 volts, si on veut conserver à l'appareil toute sa sensibilité.

BARBAUDY, 1923 (1) rappelle que l'on peut améliorer les lectures pour les grandes résistances en mettant un condensateur variable en dérivation sur la boîte de résistance. L'emploi d'un condensateur variable ordinaire ne nous a donné aucune amélioration appréciable; par contre, en utilisant des condensateurs variables isolés au quartz, nous sommes arrivés à limiter la zone de son minimum à 1/2 millimètre, même pour des résistances de 20.000 ohms.

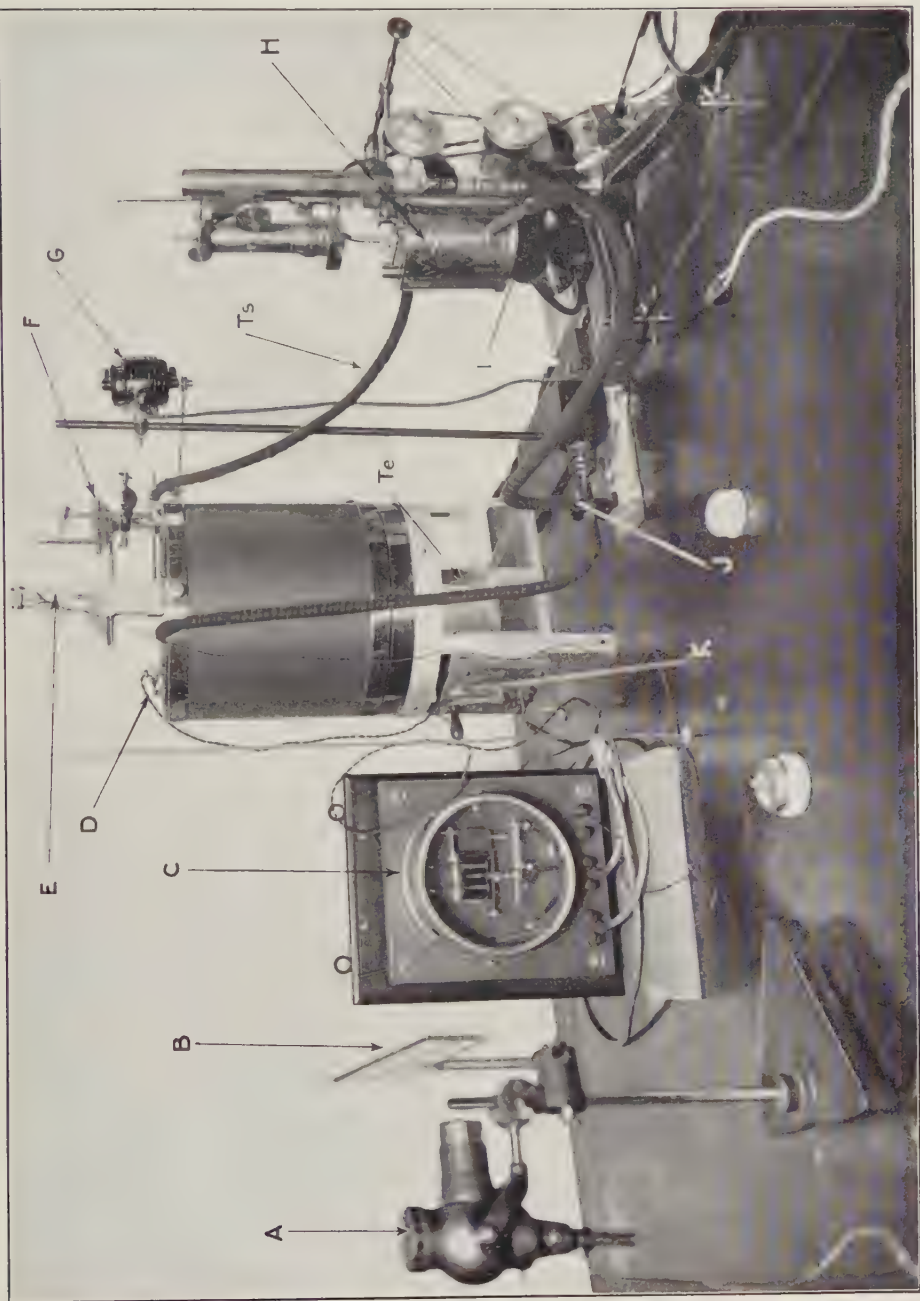
La mise à la terre d'un des pôles secondaires de la bobine, pour éviter la charge statique du pont, peut rendre des services dans certaines circonstances. En prenant toutes ces précautions, on réalise parfaitement une zone de silence.

Viscosité. — La viscosité des suspensions a été mesurée à l'aide du viscosimètre de LECOMTE DU NOUY (1931). Nous avons un peu modifié le montage proposé par l'auteur en utilisant un thermostat électrique d'OSTWALD que nous possédions. La température est maintenue aux environs de 36° C. par la résistance du thermostat d'OSTWALD. La régulation s'effectue au moyen d'une résistance complémentaire réalisée par une

(1) In *La pratique électrochimique*, par Erich MULLER, traduction Jean BARBAUDY. Paris, BERENGER, 1923, p. 66).



A : thermostat; B : boîte de résistance; C : bobine de RUHKORFF; D : amplificateur basse fréquence; E : haut parleur.



A et B : lampe et échelle; C : relai; D : résistance chauffante (lampe); E : thermorégulateur; F et G : agitateur; H : viscosimètre de Lecomte du Nouy; I : moteur à vitesse réglable et constante; J : pompe centrifuge Elva; K : résistance chauffante du thermostat d'Ostwald; Te et Ts : tuyaux d'entrée et de sortie de l'eau.

lampe de 200 watts immergée dans l'eau. Un thermorégulateur électrique de BARBAUDY complète l'appareil, ainsi qu'on peut s'en rendre compte en consultant la planche IV (1).

Trouble des suspensions — Absorption. — Les mesures ont été effectuées à l'aide du photomètre graduel de ZEISS, l'éclairage étant réalisé par la lampe Stupho. Les suspensions ont été examinées sous une épaisseur de 20 millimètres. La lecture du tambour indique l'intensité de la lumière transmise en pour cent de la lumière incidente, c'est-à-dire la transparence en pour cent. La différence entre 100 et le nombre lu donne l'absorption en pour cent. C'est cette valeur qui figure dans les tableaux.

pH. — La concentration en ions H^+ a été déterminée par voie électrométrique.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Dans une première série d'essais, nous avons envisagé la variation de la vitesse de transport, de la tension superficielle, de la viscosité, etc. au cours de l'agglutination sérique des Bactéries.

Dans un second groupe d'expériences, nous avons essayé d'abaisser expérimentalement la tension superficielle afin de stabiliser les suspensions bactériennes. Ce sont ces deux séries d'essais que nous allons résumer.

Protocole d'expérience. — Les recherches devant porter sur des systèmes de concentrations croissantes en chlorure de sodium, nous avons utilisé, comme liquide dispersif, des solutions renfermant 50, 100, 200, 9.000 mmgr. de NaCl par litre. De même, le sérum a été dilué avec des solutions contenant de 50 à 9.000 mmgr. de chlorure de sodium par litre. Dans nos essais témoins, nous avons ajouté une partie de suspension renfermant 8 milliards de germes au cm^3 à une partie de sérum dilué. Dans les expériences destinées à mettre en évidence l'action de la substance tensio-active, on employait une partie de suspension renfermant 16 milliards de germes au cm^3 , à laquelle on ajoutait une partie de solution de substance tensio-active et deux parties de sérum dilué. Une simple opération permet évidemment de connaître la concentration du système en sérum et en substance tensio-active.

(1) A noter la marche merveilleuse de la pompe centrifuge Elva.

VARIATION DE LA TENSION SUPERFICIELLE, DE LA CHARGE ÉLECTRIQUE,
DE LA VISCOSITÉ, ETC., AU COURS DE L'AGGLUTINATION SÉRIQUE
DES BACTÉRIES

Dans les tableaux IX, X, XI et XII, nous avons relaté quelques-unes des valeurs observées au cours de l'expérimentation.

TABLEAU IX

Variation de la différence de potentiel et de la tension superficielle
au cours de l'agglutination sérique de *B. caryocyaneus*

Dilution finale du sérum dans le système agglutinant : 1/1000.

Concentration du système agglutinant en chlorure de sodium : 50 mmgr 0/00

Temps	Différence de potentiel en millivolts	Tension superficielle en dynes/cm. à 22° C.	Aspect des systèmes
—	—	—	—
0	39,9	71,8	Homogène
30'	27,4	72	Très fin, précipité.
50'		72	
Témoin	47,7	76	Homogène.

L'agglutination coïncide avec un abaissement de la D. P. et de la tension superficielle.

L'examen du tableau IX montre que l'addition de sérum agglutinant, même à la dilution de 1/1000, détermine un abaissement de la tension superficielle du système. Cet abaissement, très rapide, précède toujours la formation des précipités.

Les variations de charge électrique des plastides sont toujours très rapides, mais il semble que l'on puisse considérer deux stades :

1° Abaissement instantané (ou pratiquement instantané) de la D. P. jusqu'à une certaine valeur variable avec les systèmes considérés;

2° Abaissement lent de la D. P.

Contrairement au phénomène observé par LIPPMANN, l'abaissement de la charge ne correspond pas à une élévation de la tension superficielle à la surface eau-air. Tandis que dans le chauffage des suspensions bactériennes à 80° C., l'abaissement de tension superficielle coïncide toujours avec une augmentation de la charge électrique.

Dans les tableaux XI et XII, nous constatons là encore que l'agglutination se manifeste dans des systèmes dont la tension superficielle est abaissée, il est à remarquer que cet abaissement est de l'ordre de 4 dynes/cm. dans le tableau XI et de 6 dynes/cm. dans le tableau XII.

TABLEAU X

Désignation des systèmes	Composition des systèmes		Différence de potentiel en millivolts	Aspect des systèmes
	dilution du sérum agglutinant	concentration en NaCl mmgr. o/oo		
—	—	—	—	—
Expérience n° 1				
Témoin	0	200	73,	Homogène
A	1/1000	200	18,27	Précipité
Expérience n° 2				
Témoin	0	100	49,7	Homogène
B	1/1000	100	27,4	Très fin précipité

Variation de la différence de potentiel au cours de l'agglutination. — L'examen du tableau X montre que l'agglutination correspond à un abaissement de la différence de potentiel. La D. P. est de 18,2 mlvt dans l'expérience n° 1, et de 27,4 mlvt. dans l'expérience n° 2.

Il est à remarquer que NORTHROP (1928) avait observé l'agglutination sérique du Bacille typhique pour des différences de potentiel de l'ordre de 15 ou 13 millivolts. Il y a donc, entre les valeurs trouvées par NORTHROP et celles que nous avons obtenues, une concordance relativement remarquable, du moins si nous nous en tenons à l'expérience n° 1. En effet, la concordance est beaucoup moins bonne si nous envisageons l'ex-

périence n° 2. Pour préciser le rôle possible de la charge électrique dans la précipitation des suspensions, nous rappellerons quelques-unes des valeurs observées par différents auteurs dans des suspensions diverses.

Systèmes considérés	Différence de potentiel critique en millivolts	Auteurs
Suspension de Bacille typhique.....	13 15	NORTHROP
Suspension de collodion	16	LOEB
Suspension d'huile	30	POWIS
Suspension de <i>B. tumefaciens</i>	17,95	E. SORU
Suspension de <i>B. caryocaneus</i>	18 (27)	LASSEUR et DUPAIX

L'ensemble de ces faits paraît établir l'action considérable de la charge électrique dans la coagulation des suspensions. Mais, ainsi que le fait justement remarquer BOUTARIC (1931) « *cette théorie est très simple et semble contenir une grande part de vérité. Toutefois, elle n'est pas en accord avec tous les faits observés* » (p. 123). Ce n'est donc qu'une première approximation. D'ailleurs NORTHROP (1921-1923), LASSEUR et ses Collaborateurs (1921-1928-1929-1930-1931) ont montré que la charge électrique ne suffit pas à expliquer le phénomène de l'agglutination.

Nous trouvons une nouvelle confirmation de cette hypothèse dans l'examen des tableaux XI et XII (1).

(1) Dans un récent travail, BOUTARIC et BOUCHARD (1932) expriment à peu près la même idée dans les termes suivants : « *Si, selon la théorie la plus couramment admise et qui semble contenir une grande part de vérité, la floculation est due à une neutralisation des granules colloïdaux par fixation d'ions électrolytiques de signe contraire, il semble que la floculation puisse être rattachée aux phénomènes d'adsorption, les ions les plus actifs étant alors les plus adsorbables* ». (p. 25).

TABLEAU XI

Variation de la D.P. et de la Tension superficielle
dans l'agglutination sérique de *B. caryocyanus*
en présence de quantités variables de chlorure de sodium

Désignation des systèmes	Composition des systèmes		Temps de contact	Différence de potentiel en mvt.	Tension superficielle en dynes-cm. à 22° C.	Aspect des systèmes
	Dilution du sérum agglutinant	Concentration en NaCl o/oo mmgr.				
A	—	—	—	—	—	—
	1/1.000	50	0 15 minutes	36,5 31,3	74, 72,	Homogène Très fin précipité
B	1/10.000	50	0 3 h. 30	39,2 35,3	76, 76,1	Homogène Homogène
C	1/1.000	100	0 15'	37,9 27,4	73,4	Homogène Très fin précipité
D	1/10.000	100	0 60'	40,6 35,3	76,1 75,9	Homogène Homogène
T ₁	0	50		54,8	76,	Homogène
T ₂	0	100		49,7	76,1	Homogène

TABLEAU XII

Etude comparative des caractères physico-chimiques des suspensions de *B. caryocyanus* additionnées de sérum de Lapin normal et de sérum agglutinant homologue

Désignation des systèmes	Composition des systèmes		Tension superficielle en dynes-cm à 22° C.	Caractères physico-chimiques des systèmes				
	Dilution du sérum	Concentration en NaCl mmgr. 0/00		Différence de potentiel en millivolts	Viscosité spécifique à 36° C.	Conductibilité spécifique à 25° C.	pH	Aspect macroscopique
				I. Sérum normal.				(1)
A	1/1.000	50	70,3		1,028	136,3 . 10 ⁻⁶		Homogène
B	1/1.000	100	70,		1,061	227,8 . 10 ⁻⁶		Homogène
C	1/10.000	100	76,		1,006	208,3 . 10 ⁻⁶		Homogène
D	1/1.000	200	68,	36,5	1,048	413,3 . 10 ⁻⁶	6,77	Homogène
E	1/10.000	200	76,	40,6		403,6 . 10 ⁻⁶	6,68	Homogène
				II. Sérum agglutinant				
F	1/1.000	50	69,9		1,061	131, . 10 ⁻⁶	6,52	Très fin précipité
G	1/1.000	100	69,5	39,	1,164	219, . 10 ⁻⁶		Précipité
H	1/10.000	100	76,3	43,9	1,0205	210, . 10 ⁻⁶		Homogène
I	1/1.000	200	72,	18,27	1,188	413,3 . 10 ⁻⁶	6,84	Précipité
J	1/10.000	200	76,	20,2	1,118	392, . 10 ⁻⁶	6,90	Homogène
								Examen microscopique nombreux amas
Témoin		200	76,	73,	1,001	393, . 10 ⁻⁶		Homogène

(1) Après une heure de contact entre les plastides et le sérum.

Nous voyons, en effet, que l'agglutination correspond bien à un abaissement très notable de la D. P., mais il ne faudrait pas poser en principe que l'agglutination se manifeste toujours pour une différence de potentiel donnée.

Dans le tableau XII, les plastides de l'expérience D, bien que non agglutinées, possèdent une D. P. de 36,5 mlvt., tandis que dans le système G, avec 39 mlvt. les plastides sont agglutinées. Dans le tableau XI, nous trouvons une série de systèmes homogènes, bien que la différence de potentiel soit abaissée à 36,5 et 39 mlvt. On pourrait aussi objecter que, dans l'expérience J (tableau XII), la D. P. est de 20 mlvt., bien que la suspension paraisse homogène, du moins si l'on se contente d'un examen macroscopique. Tout change avec l'examen microscopique. Le microscope décèle l'existence de nombreux amas. Nous nous trouvons en présence d'un système en voie de précipitation, car les lectures ont été faites après une heure de contact entre la suspension et le sérum homologue. Après 4 heures de contact, la suspension aurait été évidemment complètement précipitée (1), nous retrouvons donc là une expérience favorable à l'hypothèse qui fait jouer un rôle de premier plan à la D. P.

Dans le système C, tableau XI, la D. P. mesurée aussitôt le mélange effectué, est égale à 37,9 mlvt. et correspond à une suspension homogène, mais après quinze minutes de contact entre les plastides et le sérum, la D. P. tombe à 27,4 mlvt., et à ce moment les plastides sont agglutinées.

Cette expérience peut être invoquée en faveur de l'existence d'une D. P. critique.

Il n'en est pas de même des expériences D et E. En D, notamment, l'addition de sérum normal fait tomber la D. P. à 36,5 mlvt. Or, les suspensions D et E restent parfaitement homogènes. L'abaissement de la D. P. à des valeurs qui nous avaient paru critiques ne permet donc pas la précipitation des plastides, chose qui devrait se produire s'il existait une différence de potentiel critique. En effet, dans l'expérience G, les plastides sont agglutinées bien que la D. P. soit égale à 39 mlvt., c'est-à-dire à une valeur supérieure à celle observée dans l'expérience D.

Comparons maintenant l'expérience J à l'expérience H. Ces expériences sont toutes les deux effectuées avec du sérum dilué au 1/10.000, mais avec des concentrations en NaCl de 200 et 100 mmgr. par litre. Or, l'agglutination incontestable en J fait défaut en H. Nous sommes donc

(1) Ainsi que l'a prouvé l'expérience témoin.

obligés de reconnaître le rôle secondaire, mais important, des électrolytes dans l'abaissement de la différence de potentiel.

En résumé, l'agglutination coïncide avec un abaissement considérable de la D. P., mais il est des cas où, de deux systèmes abaissés à la même D. P., l'un peut être agglutiné et l'autre formé de plastides isolées.

Les valeurs trouvées pour la D. P. sont évidemment trop faibles, car la viscosité spécifique de la suspension augmente très notablement durant l'agglutination. Il en résulte que la vitesse de déplacement des plastides dans le champ électrique est certainement diminuée et, en tenant compte de ce facteur, on obtiendrait des valeurs plus grandes de la D. P., ce qui aurait comme conséquence une diminution de l'importance apparente de la D. P. dans le phénomène de l'agglutination. Nous sommes ainsi conduits à étudier un autre paramètre et, à défaut de la tension à l'interface plastide-liquide, nous envisageons la tension à la surface de séparation liquide-air.

Variation de la tension superficielle au cours de l'agglutination. — L'examen des différents tableaux montre que, dans tous les systèmes agglutinés, la tension superficielle est abaissée. Si cette observation plaide en faveur de l'action de la tension superficielle sur l'agglutination, elle ne démontre pas l'exactitude du fait, car, avec le sérum normal (sérum de Lapin), on détermine des abaissements de tension superficielle absolument du même ordre qu'avec le sérum agglutinant, sans qu'il y ait pour cela agglutination. De plus, d'après les idées admises, l'abaissement de la tension superficielle devrait conduire à la stabilisation et non à la précipitation des suspensions bactériennes. Nous voyons donc déjà apparaître une première complication.

Considérons les systèmes B et F du tableau XII. Dans le système B (sérum normal) la tension superficielle est de 70 dynes/cm. (tableau XII), dans le système F (sérum agglutinant et plastides précipitées) la tension superficielle est de 69,9 dynes/cm. Il y a plus, dans l'expérience J (tableau XII) où la dilution du sérum atteint le 1/10.000, la tension superficielle est de 76 dynes/cm., identique à celle du témoin, et identique à celle du système E, réalisé avec du sérum normal, et cependant, en J, les Bactéries sont agglutinées.

Dans des systèmes différents, un abaissement de tension superficielle déterminé ne coïncide donc pas avec un même aspect, un même état, des suspensions bactériennes.

Dans ces expériences, la tension superficielle ne paraît donc pas intervenir directement, il n'en serait peut-être pas de même si on la reliait au volume des plastides bactériennes, c'est-à-dire au « *poids efficace* » au sens de J. PERRIN, et à la pression osmotique de J. DUCLAUX. Pour vérifier le bien fondé de cette hypothèse, nous avons institué des expériences dans lesquelles nous avons essayé d'empêcher l'agglutination par abaissement expérimental de la tension superficielle des systèmes agglutinables. Pour cela, nous avons eu recours à l'addition de substances tensio-actives telles que l'oléate de soude, le taurocholate et le glycocholate de soude. Cette expérimentation, nous le verrons, comporte plus d'une difficulté.

ABAISSEMENT EXPÉRIMENTAL DE LA TENSION SUPERFICIELLE
ET STABILISATION DES SYSTÈMES AGGLUTINANTS
PAR ADDITION DE SUBSTANCES TENSIO-ACTIVES

Avant d'envisager les résultats obtenus dans cette nouvelle série d'essais, nous dirons deux mots sur la solution d'oléate de soude que nous avons utilisée.

L'oléate de soude a été préparé par notre vénéré Maître, M. le Professeur FAVREL, à partir d'acide oléique « *puriss.* » de MERK. La solution-mère contenait 82,85 grammes d'oléate de soude pour 1000 grammes d'eau distillée.

Additionnée de phénolphthaléine, cette solution ne se colore pas, mais si on la dilue au 1/8 ou au 1/16 avec de l'eau bidistillée, la solution devient rouge. Par addition de chlorure de sodium, la solution rouge passe au rose très faible.

Avec la solution-mère, réalisons une solution d'oléate à 5 % dans l'eau bidistillée. Prélevons deux parties aliquotes A et B auxquelles nous ajoutons respectivement de la phénolphthaléine et de la phénolsulfonephthaléine. Dans le premier cas (phénolphthaléine), la solution est à peine rosée ; dans le second (phénolsulfonephthaléine), la solution vire au rouge. Si on dilue, la partie additionnée de phénolphthaléine (solution A) devient rouge, et la solution B reste rouge. Si on ajoute de l'alcool, la coloration disparaît en A.

Enfin, effectuons les trois mélanges ci-dessous et nous observons les colorations suivantes :

- 1) Alcool à 95° + trace de soude + phénolphthaléine = coloration rouge.
- 2) Solution oléate à 5 % + phénolphthaléine = très légère coloration rose.
- 3) Solution (1) + solution (2) = mélange incolore.

Nous avons signalé ces singularités pour montrer une fois de plus l'importance des causes d'erreur dans la détermination du pH par voie colorimétrique.

Afin de voir dans quelle mesure la dissociation électrolytique ou la précipitation des savons par les électrolytes pourrait être invoquée pour expliquer les faits ci-dessus, nous avons effectué quelques mesures de pH et de conductibilité que nous résumons dans les lignes suivantes :

Solution d'oléate à 5 %	pH = 8,87
5 cm ³ sol. oléate à 5 % + 5 cm ³ eau bidistillée....	pH = 9,16
5 cm ³ sol. oléate à 5 % + 5 cm ³ eau physiologique.	pH = 9,16
5 cm ³ sol. oléate à 5 % + 5 cm ³ alcool à 95 (1) ..	pH = 7,40

Les mesures de conductibilité ci-dessous paraissent pouvoir s'interpréter dans le même sens :

Solution d'oléate à 0,25 % dans l'eau bidistillée additionnée de 100 mmgr. o/oo
NaCl pour laquelle $K = 2214.10^{-6}$
Solution d'oléate à 0,5 % dans l'eau bidistillée additionnée de 100 mmgr. o/oo
NaCl pour laquelle $K = 2296.10^{-6}$
Solution d'oléate à 1 % dans l'eau bidistillée additionnée de 100 mmgr. o/oo
NaCl pour laquelle $K = 2460.10^{-6}$

Ces remarques étant faites, nous envisageons maintenant l'influence des substances tensio-actives sur la marche de l'agglutination sérique de *B. caryocyanus*.

Nous résumons dans les tableaux XIII, XIV et XV les résultats de ces expériences.

(1) ARRHÉNIUS a montré que l'addition de sucre ou d'alcool à l'eau modifie dans le même rapport le coefficient de diffusion et la conductivité électrique. Dans l'exemple cité par V. HENRI (1906), la conductivité varie de 100 (solution d'iodure de potassium dans l'eau) à 50 (solution d'iodure de potassium dans l'eau additionnée de 27,9 % d'alcool). Et LEWIS (1920) admet une relation entre la conductivité d'une solution et la fluidité du solvant.

TABLEAU XIII

Action de différentes substances tensio-actives
sur la dilution limite d'agglutination

Anticorps: *agglutinine* - *B. caryocyaneus*.

Antigène: *B. caryocyaneus*.

Substances tensio-actives	Concentration en substance tensio-actives mmgr. %	Concentration en NaCl mmgr. o/oo	Dilution limite d'agglutination
Glycocholate de soude ..	500	9.000	1/8.000
	250	9.000	1/16.000
	125	9.000	1/64.000 (amas plus petits que dans Témoin)
	Témoin	9.000	1/64.000
Taurocholate de soude ..	125	100	1/1.000
	62,5	100	1/12.000
	31,25	100	1/12.000
	Témoin	100	1/12.000
	1000	9.000	1/1.000
	500	9.000	1/1.000
	250	9.000	1/1.000
	125	9.000	1/1.000
	Témoin	9.000	1/64.000
Oléate de soude	250	100	< 1/200
	Témoin	100	1/12.000
	250	9.000	< 1/200
	Témoin	9.000	> 1/48.000

En première approximation, l'abaissement de la tension superficielle paraît stabiliser les suspensions bactériennes. En effet, le taux d'agglutination est diminué considérablement avec certains sels, notamment avec l'oléate de soude. L'influence de ce sel est d'autant plus marquée que la concentration en chlorure de sodium est plus élevée.

Dans les systèmes renfermant 9 gr. 0/00 de chlorure de sodium et additionnés d'oléate de soude, le pouvoir agglutinant est au moins 240 fois plus petit que dans ces mêmes systèmes dépourvus de substance tensio-active.

L'abaissement du pouvoir agglutinant du sérum est manifeste avec le taurocholate, quelle que soit la concentration du système en NaCl. Par contre, le glycocholate paraît avoir une action beaucoup plus faible que le taurocholate. La dilution limite d'agglutination est bien diminuée, par l'addition de glycocholate, dans le rapport de 1 à 8 par exemple, mais il semble que l'agglutination, en présence et en l'absence de glycocholate, se différencie beaucoup plus par l'allure de l'agglutination que par le taux d'agglutination. Avec le glycocholate, on n'observe jamais la formation de gros flocons, même pour les fortes concentrations en sérum, on obtient toujours un très fin précipité.

En résumé, *en abaissant la tension superficielle par l'oléate de soude et les sels biliaires, il est possible de stabiliser les suspensions bactériennes au point de les rendre insensibles à l'action précipitante du sérum homologue, du moins pour une concentration donnée en sérum agglutinant.*

Nous allons essayer de pénétrer un peu plus avant dans l'étude du mécanisme de ce phénomène en envisageant la variation des différents paramètres.

VARIATION DE LA TENSION SUPERFICIELLE,
DE LA DIFFÉRENCE DE POTENTIEL, DU pH
ET DE LA CONDUCTIBILITÉ PAR ADDITION DE SUBSTANCES
TENSIO-ACTIVES AUX SYSTÈMES AGGLUTINANTS.

TABLEAU XIV

Action de l'oléate de soude sur la marche de l'agglutination sérique
de *B. caryocyaneus*

Désignation des systèmes	Composition des systèmes		Tension superficielle en dynes-cm. à 22° C.	Différence de potentiel en millivolts	pH des systèmes	Aspect des systèmes (1)
	Concentration en oléate mmgr. %	dilution du sérum				
A	250	1/500	28,6	67,6	8,63	Homogène
B	0	1/500	70,	23,9	6,57	Précipité
T ₁	0	0	76,		6,56	Homogène
T ₂	250	0	29,2		8,61	Homogène
C	250	1/500	29,7		8,04	Homogène
D	0	1/500	64,		6,47	Dépôt liquide clair
T ₃	0	0	75,3		6,46	Homogène
T ₄	250	0	29,9		8,02	Homogène

Remarque. — Les systèmes A, B, T₁, T₂ renferment 100 mmgr. de NaCl 0/00. Les systèmes C, D, T₃, T₄ contiennent 9.000 mmgr. de NaCl 0/00.

Le tableau XIV paraît éminemment suggestif, en effet, considérons les systèmes A et B, nous constatons que le système A est homogène, ce qui s'explique fort bien par une tension superficielle très basse (28,6 dynes/cm.) et une D. P. très élevée, tandis que le système témoin (B), qui n'a pas reçu d'oléate, est agglutiné avec une tension superficielle élevée et une D. P. abaissée à 23,9 mlvt. Les expériences C et D paraissent s'interpréter de la même façon, bien que, dans le cas particulier, la D. P. n'ait pas été déterminée en raison des causes d'erreur

(1) Après 4 heures de contact.

TABLEAU XV

Action du taurocholate de soude sur la marche de l'agglutination sérique de *B. caryocyanus*

Désignation des systèmes	Composition des systèmes			Caractères physico-chimiques des systèmes			
	Concentration en taurocholate mmgr. %	Dilution du sérum	Tension superficielle en dynes-cm. à 22° C.	Différence de potentiel en mlvt.	Conductibilité spécifique à 25° C.	Aspect des systèmes	pH
A	0	1/500	70,5	33,2	254.10 ⁻⁶	après 10': amas moyens et petits	5,31
B	0	1/8.000	76,	43,9	215.10 ⁻⁶	après 10': suspension homogène après 40': précipité	
C	62,5	0	45,2			homogène	
D	62,5	1/500	45,9	36,5	594.10 ⁻⁶	petits amas et formes isolées	5,91
E	62,5	1/8.000	48,4	42,2	566.10 ⁻⁶	homogène	
F	125	0	45,	48,7		homogène	
G	125	1/500	43,	33,8	948.10 ⁻⁶	après 10': très petits amas	5,56
H	125	1/8.000	44,4	43,9	927.10 ⁻⁶	homogène	

Remarque. — Tous les systèmes renferment 100 mmgr. de NaCl o/oo.

inhérentes aux mesures de ce genre dans les milieux riches en électrolytes. Si l'on ne s'en tenait qu'aux expériences faites avec l'oléate, il semblerait bien que le schéma général de V. HENRI soit vérifié. Voyons maintenant s'il en est ainsi en nous adressant à d'autres substances tensio-actives. Ces essais nous paraissent d'autant plus justifiés que l'addition de différentes substances tensio-actives aux milieux de culture ne nous a pas toujours donné des résultats comparables.

Le tableau XV présente une particularité sur laquelle nous désirons attirer l'attention du lecteur. Afin de suivre la marche du phénomène, nous avons fait figurer dans ce tableau non seulement les valeurs obtenues après 2 heures de contact entre les plastides et le sérum, mais encore les valeurs déterminées après 10 minutes de contact. Il ne faut pas oublier que des suspensions peuvent paraître homogènes après 10 minutes d'action du sérum et être complètement précipitées après des temps d'action de 1 heure, 2 heures ou 4 heures.

Ces réserves faites, considérons le tableau XV, nous constatons que les systèmes A et B offrent des tensions superficielles assez voisines, ou du moins relativement très élevées, tandis qu'ils présentent des D. P. nettement différentes. Dans ce cas, l'agglutination paraît être en rapport avec une chute de la D. P.

Comparons maintenant les expériences B et H, la D. P. est la même (43,9 mlvt.) tandis que les tensions superficielles diffèrent de 31,6 dynes/cm. Un abaissement de la tension superficielle à 44,4 dynes/cm. en H explique fort bien l'absence d'agglutination dans ce système.

Première complication. — Les systèmes F, G, H offrent des tensions superficielles très voisines. Etant donnée la précision des mesures, on peut dire qu'elles sont pratiquement du même ordre de grandeur, tandis que les D. P. varient de 33,8 mlvt. à 48,7 mlvt. Or, un seul des systèmes est précipité, les deux autres sont homogènes. Au premier abord, l'agglutination semble être en relation avec la D. P.

Un examen moins superficiel révèle une anomalie difficilement explicable : c'est l'agglutination des systèmes dont la tension superficielle est abaissée jusqu'à 43 dynes/cm. (expériences G). Dans cette expérience, il est donc nécessaire de faire intervenir un troisième facteur d'action.

Ces faits nous conduisent à envisager des facteurs d'action autres que la D. P. et la tension superficielle dans le phénomène de l'agglutination.

Deuxième complication. — Pour expliquer les anomalies que nous venons de relater, le pH ne saurait être invoqué, ni avec le taurocholate, ni avec le glycocholate. Les systèmes agglutinants additionnés de ce dernier sel ont montré un pH variant de pH = 6,58 à pH = 6,77.

Il n'en est plus de même lorsqu'on considère le pH des systèmes A et C additionnés d'oléate (tableau XIV). Dans ces deux expériences, le pH atteint 8,63 et 8,04. Or, nous avons montré (1931) qu'avec certaines solutions tampons et pour des pH variant de 6,28 à 9, la dilution limite d'agglutination passe de 1/64000 à 1/32000. Dans les essais qui font l'objet de ce chapitre, nous utilisons le sérum à la dilution du 1/500, et de ce fait le pH ne peut pas avoir une influence très marquée dans les expériences résumées dans le tableau XIV. Cependant ce facteur d'action ne peut pas être négligé *a priori*. En effet, l'addition d'oléate modifie considérablement l'opacité, le trouble des suspensions bactériennes ainsi que nous allons le voir en considérant le tableau XVI.

TABLEAU XVI

Action de l'oléate de soude sur le trouble des suspensions bactériennes

Désignation des systèmes	Concentration des systèmes en		Absorption (en %) des suspensions de				
	NaCl mmgr. %	Oléate de soude mmgr. %	<i>B. cyanoo- fluorescens</i>	<i>B. chlororaphis</i>	<i>B. mesentericus niger</i>	<i>P. prodigiosus</i>	<i>B. caryocyanus</i>
A	9.000	0	87	85	92,5	97,75	93,5
B	9.000	500	61	74	97,5	94,5	75
C	100	0	80	77,5	93,	97	90,5
D	100	500	27	6	96,5	94	60

Jetons un coup d'œil sur le tableau XVI.

Nous constatons que l'addition d'oléate de soude diminue le trouble des suspensions microbiennes. L'intensité de cet éclaircissement varie avec l'espèce bactérienne et la concentration des systèmes en *chlorure de sodium*. Il y a plus, cette influence du chlorure de sodium sur l'opacité des suspensions bactériennes s'observe même en l'absence d'oléate. L'absorption est respectivement égale à 93,5 ou 90,5 suivant qu'on utilise l'eau physiologique ou l'eau renfermant 100 mmgr. o/oo de NaCl comme liquide dispersif des plastides de *B. caryocyanus*. Il est bien entendu

que l'on prend toutes les précautions pour que ces différences de trouble ne soient pas imputables à des erreurs d'expérience. Cette remarque étant faite, revenons à l'influence de l'oléate, nous constatons que toutes les espèces bactériennes expérimentées ne sont pas également sensibles à l'action de l'oléate. C'est ainsi qu'avec *B. mesentericus niger*, on observe un phénomène inverse. Il faut reconnaître toutefois que *B. mesentericus niger*, Bacille sporogène « *prenant le GRAM* » se comporte différemment des Bactéries asporogènes « *ne prenant pas le GRAM* ». Nous avons déjà observé cette différence d'action des substances tensio-actives lorsque nous avons étudié l'influence des sels biliaires et de l'oléate de soude sur la forme, la végétation et la chromogénèse de certaines Bactéries. De ces faits, rapprochons l'inégale résistance des espèces bactériennes aux ions OH—. Dans un mémoire précédent, nous avons montré que l'opacité des suspensions de Bactéries sporogènes (groupe *subtilis-mesentericus-megatherium*), de Staphylocoque, etc., n'est pas sensiblement influencée par les ions OH—, tandis que les suspensions de Bactéries se décolorant par la méthode de GRAM subissent un éclaircissement de valeur variable, mais toujours très rapide. Pour expliquer ces faits, nous avons émis l'hypothèse suivante⁶: les Bactéries « *prenant le GRAM* », les Bactéries « *ne prenant pas le GRAM* » ne sont pas également sensibles à l'hydratation. Nous reviendrons tout à l'heure sur ce point particulier. Bornons-nous maintenant à rechercher une relation entre la tension superficielle et la diminution du trouble bactérien. Pour cela examinons le tableau XVII.

TABLEAU XVII

Action de l'oléate de soude sur le trouble des suspensions de *B. caryocyaneus*

Désignation des systèmes	Concentration des systèmes en oléate mmgr. %	Tension superficielle en dynes-cm à 22° C	Absorption en %	pH	Conductibilité spécifique à 25° C.
—	—	—	—	—	—
Eau physiologique					
A	0	75,3	93,5	6,46	14.835×10^{-6}
B	500	30,1	75,	9,37	22.380×10^{-6}
C	250	29,9	76,	8,02	21.420×10^{-6}
Eau 0,100 o/oo NaCl					
D	0	76,	90,5	6,56	1.536×10^{-6}
E	500	29,	60,	9,44	1.414×10^{-6}
F	250	29,2	61,	8,61	1.476×10^{-6}

Dans les systèmes B et C, l'éclaircissement des suspensions coïncide avec un abaissement considérable de la tension superficielle. Il en est de même pour les systèmes E et F. Deux hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer la diminution du trouble.

1) la lyse, c'est-à-dire la peptisation, la dissolution des plastides bactériennes;

2) l'hydratation (1).

Hydratation et peptisation. — Nous avons déjà été conduits (en 1931) à envisager ces deux hypothèses dans l'étude de l'action des ions OH— sur le trouble des suspensions bactériennes. A la suite d'examen^s microscopiques et ultramicroscopiques comparatifs, nous avons admis l'altération, la fragmentation, la peptisation du plus petit nombre et l'hydratation du plus grand nombre des plastides.

L'éclaircissement des suspensions bactériennes sous l'action des ions OH— peut donc être attribué en partie à la peptisation et surtout à l'hydratation.

A la suite de ses études sur la résistance électrique du protoplasme, Martin FISCHER a été conduit à considérer le protoplasme non pas comme étant une solution de diverses substances dans l'eau, mais comme une solution d'eau dans la «*protoplasmic material* », comparable à la solution d'eau dans le phénol.

Dans les expériences relatées au tableau XVII, nous devons donc considérer : 1° l'abaissement de la tension superficielle; 2° l'élévation du pH, qui peut atteindre 9,44. Cette concentration en ions OH— est suffisante, nous l'avons vu (LASSEUR, DUPAIX, OLIVIER, 1931), pour déterminer une diminution du trouble des suspensions bactériennes; mais dans nos nouvelles expériences, l'hydratation paraît acquérir plus d'importance que dans nos expériences de 1931. C'est ainsi que les systèmes B et C, par exemple, offrent des pH très différents, 8,02 et 9,37, et cependant le trouble des suspensions bactériennes est du même ordre en

(1) Martin FISCHER, à qui l'on doit des travaux fondamentaux sur l'hydratation et le gonflement des protéines, considère l'hydratation (1915) comme un processus par lequel la protéine entre en combinaison physico-chimique avec son dissolvant : l'eau, tandis que la solution correspondrait à une augmentation du degré de dispersion du colloïde. Pour ce savant, la marche des deux phénomènes est opposée. Les particules colloïdales les plus finement dispersées sont incapables de fixer autant d'eau que les particules grossièrement dispersées.

B et en C. En effet, l'absorption en pour 100 est de 76 dans le premier cas et de 75 dans le second. On observe le même phénomène avec les systèmes E et F. Dans ces quatre systèmes, l'éclaircissement des suspensions bactériennes ne peut pas s'expliquer exclusivement par l'action de ions OH—. Dans le système C, le pH est de 8,02, il faut donc faire intervenir l'autre paramètre, la variation de la tension superficielle. On sait qu'à la suite des travaux de SZYZKOWSKI (1908), différents auteurs : SEITH, FREUNDLICH et SCHNELL ont essayé de déterminer le degré d'hydratation en fonction de la tension superficielle. C'est pour cela que nous avons effectué comparativement des examens microscopiques et ultramicroscopiques des suspensions témoins et des suspensions additionnées d'oléate de soude.

Examen microscopique. — L'examen microscopique du système A (tableau XIV) est extrêmement difficile, en raison des modifications considérables de l'indice de réfraction. On ne perçoit, en effet, nettement que quelques rares plastides par champ microscopique. Après de nombreux tâtonnements dans le réglage de l'éclairage et en supprimant toute lumière parasite (obscurité de la salle de travail) on aperçoit une image floue de nombreuses plastides. On rencontre néanmoins quelques rares amas très lâches, formés de plastides paraissant offrir une gélification intense. Ce fait rappelle singulièrement le phénomène décrit par ROGER (1896) avec *Oidium albicans*.

Les plastides de la suspension C, effectuée en eau physiologique, sont plus facilement perceptibles que celles du système A, tout en l'étant infiniment moins qu'en l'absence d'oléate de soude (système B et D). Nous retrouvons donc là, superposées, l'action du chlorure de sodium et de l'oléate de soude sur l'opacité des suspensions et l'aspect des plastides bactériennes.

En résumé, un examen superficiel laisse penser à une disparition d'un grand nombre de plastides. Un examen plus approfondi conduit à considérer cette diminution du nombre des plastides comme étant beaucoup plus faible qu'on aurait pu le croire tout d'abord. Et il faut admettre une modification profonde de la nature du cytoplasme bactérien.

Voyons maintenant comment les choses se passent si on substitue l'examen ultramicroscopique à l'examen microscopique.

Examen ultramicroscopique. — Les suspensions effectuées dans l'eau physiologique et non additionnées d'oléate de soude, ni de sérum, sont constituées par des plastides arrondies, ovalaires ou allongées, possé-

dant une membrane très blanche, très réfringente. Cette membrane est incontestablement rigide, ainsi que l'on s'en rend compte en observant les mouvements vitaux des plastides réunies en diplobacilles.

Considérons maintenant les suspensions additionnées de 0 gr. 250 % d'oléate de soude.

On constate l'existence de deux catégories d'éléments :

1° des germes peu nombreux, possédant une membrane et des grains blanc-jaunâtre très brillants. Ces plastides ont des dimensions sensiblement normales.

2° des germes très nombreux, dont le volume a considérablement augmenté, présentant une membrane élastique qui se résout à une ligne bleuâtre ou blanc-bleuâtre, ainsi qu'on peut s'en rendre compte par l'étude approfondie du mouvement et de la forme de ces plastides. Celles-ci peuvent souvent offrir des protubérances, des sortes de hernies.

Il semble résulter de ces examens qu'il y a une modification profonde de la nature des plastides bactériennes sous l'influence de l'oléate. Que certaines plastides soient détruites par ce processus, le fait ne paraît pas douteux, quant à la proportion des éléments ainsi désintégrés, de nouvelles recherches en cours nous permettront de préciser ce point.

Avec l'oléate, nous avons une exagération des phénomènes observés avec le taurocholate et le glycocholate. Au premier abord, l'emploi de cet électrolyte paraît donc tout indiqué pour étudier la stabilisation des suspensions bactériennes. Ce n'est là qu'une première approximation, puisque deux actions se superposent : 1° celle des ions OH^- ; 2° celle de la substance tensio-active.

Sous ces réserves, voyons maintenant comment nous pouvons relier nos observations aux phénomènes de stabilisation des suspensions bactériennes.

INTERPRÉTATION

L'ensemble des faits que nous venons d'examiner nous a conduits à la notion d'hydratation. Si l'on veut bien se souvenir que le glycocholate et le taurocholate de soude stabilisent les suspensions bactériennes sensiblement au même titre que l'oléate de soude, nous voyons que l'on ne peut pas ramener exclusivement à une question de pH la stabilisation des suspensions bactériennes, par les substances tensio-actives. Que l'action du pH s'ajoute à celle de la tension superficielle dans

l'exemple de l'oléate, on ne saurait le contester; mais il ne faut pas oublier que, dans le cas des sels biliaires, le pH varie de 5,31 à 6,77. Cette zone des pH est très favorable à l'agglutination. Nous sommes donc ainsi conduits à admettre que la stabilisation des suspensions bactériennes par addition de taurocholate, glycocholate et oléate de soude est due à l'abaissement de la tension superficielle et à l'hydratation corrélative des plastides bactériennes.

On sait que le poids spécifique des plastides bactériennes est supérieur à 1 (1,3 pour le Vibron cholérique, 1,14 pour le Bacille typhique) (GOTSCHILCH, 1929) (1). Il est évident que par gonflement des plastides, on diminue le « *poids efficace* », au sens de J. PERRIN, et de ce fait, on augmente la stabilité des suspensions bactériennes.

C'est cette relation entre la tension superficielle et le gonflement que nous nous efforçons de préciser actuellement dans nos expériences en cours.

QUELQUES CONCLUSIONS

Dans ce paragraphe, nous ne pouvons pas faire figurer toutes les conclusions auxquelles nous sommes arrivés. Nous nous contenterons de mentionner celles qui nous ont paru les plus importantes :

- 1° L'agglutination a lieu avant le point isoélectrique;
- 2° L'agglutination sérique des Bactéries coïncide avec un abaissement notable de la D. P.
- 3° Cet abaissement est surtout fonction de la concentration en électrolytes.
- 4° L'agglutination sérique des Bactéries coïncide avec un abaissement variable de la tension superficielle des systèmes agglutinants.
- 5° Cet abaissement est surtout fonction de la concentration en sérum.
- 6° La D. P. est abaissée presque instantanément jusqu'à une certaine valeur variable avec les systèmes considérés, puis la D. P. continue à décroître lentement avec le temps, jusqu'à une limite qui dépend de la nature du système considéré.

(1) Il s'agit évidemment de déterminations peu précises, mais la sédimentation d'une part et la possibilité de centrifugation d'autre part, journellement utilisées, démontrent indiscutablement que le poids spécifique des Bactéries est supérieur à 1.

7° L'abaissement de la tension superficielle est surtout sensible dans les premiers instants, elle varie peu avec le temps (1).

8° Il n'y a pas une D. P. critique, mais des D. P. critiques dont les valeurs varient avec les systèmes considérés et cela pour un même germe et un même sérum.

9° Avec le sérum normal, sans qu'il y ait agglutination, on détermine des chutes de tension superficielle et des abaissements de différence de potentiel qui, pour des sérums agglutinants, coïncideraient avec l'agglutination.

10° L'agglutination sérique de *B. caryocyaneus* correspond à une augmentation de la viscosité.

11° L'agglutination peut être réalisée dans des systèmes où la tension superficielle est abaissée à 43 dynes/cm., la D. P. étant de 33,8 mlvt.

12° On peut stabiliser les suspensions bactériennes et s'opposer à l'agglutination sérique des Bactéries, en abaissant la tension superficielle par addition de substances tensio-actives.

13° La stabilisation coïncide non seulement avec un abaissement de la tension superficielle, mais encore avec une hydratation des plastides.

14° La D. P., la tension superficielle, la viscosité et le pH ne suffisent pas à expliquer tous les phénomènes observés. Il faut faire intervenir d'autres paramètres.

BIBLIOGRAPHIE

HISTORIQUE

BORDET (J.). — *Ann. Inst. Past.*, T. 10, n° 4, p. 193-219, 1896.

CHARRIN (A.) et ROGÈR (H.). — *C. R. Acad. Sc.*, T. 109, n° 19, p. 710-713, 4 novembre 1889; *C. R. Soc. biol.*, T. 41, p. 667-669, 23 novembre 1889; T. 42, p. 195-198, 1890.

GRUBER (M.). — *Archiv. f. Hyg.*, Bd. 20, p. 123-151, 1894; *Munch. med. Wochenschr.*, 43 Jhrg., n° 9, p. 206-207, 1896; *Deutsch. med. Wochenschr.*, T. 22, n° 15, p. 234-235, 1896.

GRUBER (M.) et DURHAM (H.-E.). — *Munch. med. Wochenschr.*, 43 Jhrg., n° 13, p. 285-286, 1896.

ISSAIEFF (B.). — *Ann. Inst. Past.*, T. 7, p. 260-285, 1893.

(1) La sédimentation des plastides détermine un phénomène inverse : l'augmentation progressive de la tension superficielle.

- LASSEUR (Ph.). — *Volume Jubilaire Professeur Roger*, Paris, Masson, 1932.
- METCHNIKOFF (E.). — *Ann. Inst. Past.*, T. 6, p. 473, 1891.
- PFEIFFER (R.). — *Deutsch. med. Wochenschr.*, T. 22, n° 7, p. 97-102 et n° 8, p. 119-122, 1896.
- PFEIFFER (R.) et ISSAEFF (B.). — *Zeitschr. f. Hyg.*, Bd. 17, p. 355-400, 1894.
- PFEIFFER (R.) et KOLLE (W.). — *Deutsch. med. Wochenschr.*, T. 22, n° 12, p. 185-186, 1896.
- PORGES (O.). — *Wien. med. Wochenschr.*, 77 Jhrg., n° 23, p. 749-750, 1927.
- ROGER (H.). — *Revue génér. Sc.*, T. 7, n° 18, p. 770-775, 1896.
- WIDAL (F.). — *Soc. med. hôpitaux*, 3^e série, T. 13, p. 561-566, 1896.
- WIDAL (F.) et SICARD (A.). — *C. R. Soc. biol.*, T. 48, p. 1073-1075, 1896.

MÉCANISME

- ACHARD (Ch.), BOUTARIC (A.) et DOLADILHE (M.). — *C. R. Acad. Sc.*, T. 194, p. 1877, 1932.
- ALVERDES (F.). — *Biol. Centralbl.*, Bd. 43, p. 50-70, 1923.
- AOKI (K.). — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Bd. 105, p. 313, 1927-1928; Bd. 107, p. 428-431, 1928.
- ARRHENIUS (S.). — *Zeitschr. f. physik. chemie*, Bd. 46, p. 415, 1904.
- ASAKAWA. — *Zeitschr. f. Hyg.*, Bd. 45, p. 93, 1904.
- BECHHOLD (H.). — *Zeitschr. f. physik. Chemie*, Bd. 48, p. 385, 1904.
- BEGUET (M.). — *C. R. Acad. Sc.*, T. 183, p. 323, 1926; *Arch. Inst. Past.*, Alger, T. 5, fasc. I, p. 25, 1927.
- BILTZ (W.). — *Zeitschr. f. physik. Chem.*, Bd. 48, p. 615, 1904; *Zeitschr. f. Elektrochem.*, Bd. 10, p. 668, 1904.
- BOIRON (H.). — *Thèse pharmacie*, Marseille, 105 pages, 1932.
- BORDET (J.). — *Ann. Inst. Past.*, T. 13, p. 225, 1899; *Traité de l'Immunité*, Paris, Masson, p. 287-302, 331-348, 1920; *Traité de l'Immunité dans les maladies infectieuses*, Paris, Masson, 720 pages, 1920.
- BORDET (J.) et SLEESWYK. — *Ann. Inst. Past.*, T. 14, p. 476, 1910.
- BOUTARIC (A.). — *Recherches sur la flocculation des colloïdes*; *Acad. Sc., Arts et Belles Lettres*, Dijon, 21 pages, 1925; *Journ. Chimie phys.*, T. 23, n° 10, p. 851-870, 1926; *C. R. Acad. Sc.*, T. 188, p. 450, 1929; *Journ. chimie physique*, T. 26, n° 9, p. 492-496, 1929; *Les colloïdes et l'état colloïdal*, Alcan, Paris, 1930; *Bull. soc. chimique de France*, 4^e série, T. 49, p. 389, 1931; *Revue scientifique*, 69^e année, n° 5, p. 129-139, 1931.
- BOUTARIC (A.) et DUPIN (M.). — *Bull. Soc. chimique de France*, 4^e série, T. 43, p. 1059, 1062, 1928; T. 45, p. 28-29, 1929.
- BOUTARIC (A.) et MANIÈRE (Y.). — *Bull. Classe des Sciences, Acad. roy. de Belgique*, p. 571-577, 1924; *C. R. Acad. Sc.*, T. 180, p. 1841, 1925; T. 181, p. 913, 1925.
- BOUTARIC (A.) et PERREAU (G.). — *C. R. Acad. Sc.*, T. 179, p. 46, 1924; T. 180, p. 1337, 1925; T. 181, p. 511, 1925; T. 183, p. 205, 1926; *Journal de Chimie physique*, T. 24, n° 7, p. 496-506, 1927; *Bull. Soc. chimique de France*, 4^e série, T. 45, p. 45, p. 701-706, 1929; *C. R. Acad. Sc.*, p. 868, 1930.

- BOUTARIC (A.) et ROY (M.). — *C. R. Acad. Sc.*, T. 190, p. 272, 1930; *Journ. de Pharmacie et de Chimie*, 8^e série, T. 14, p. 113, 1931.
- BOUTARIC (A.) et SEMELET (C.). — *Journ. de Chimie physique*, T. 26, n° 4, p. 195-201, 1929.
- BOUTARIC (A.) et TOURNEUR (Ch.). — *C. R. Acad. Sc.*, T. 193, p. 1011, 1931.
- BOUTARIC (A.) et VUILLAUME (M.). — *Journ. Chimie physique*, T. 21, n° 3, p. 247-264, 1924.
- BRAUN (H.) et NODAKE (R.). — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Orig., Bd. 92, p. 429-434, 1924.
- BRUN (L.). — *Thèse médecine*, Lyon, 1928.
- BUCHANAN. — *Journ. of Bact.*, T. 4, p. 73, 1919.
- BUXTON (H.) et SHAFFER (Ph.). — *Zeitschr. f. physik. chem.*, Bd. 57, p. 47-63, 1908.
- BUXTON (H.) et TEAGUE (O.). — *Zeitschr. f. physik. Chem.*, Bd. 57, p. 64-75, 1908.
- CALGREN (O.). — *Zeitschr. f. allg. Physiol.*, Bd. 5, p. 123-130, 1905.
- CERNOVODEANU (P.) et HENRI (V.). — *C. R. Soc. biol.*, T. 2, p. 200, 1906.
- CLUZET, ROCHAIX et KOEMAN. — *C. R. Soc. biol.*, T. 38, p. 779, 1923.
- COPLANS. — *Journ. Path. and Bact.*, T. 17, p. 130, p. 132, 1912-1913.
- DA COSTA CRUZ. — *C. R. Soc. biol.*, T. 100, p. 932, 1929.
- CRAW (A.). — *Journ. of Hyg., Cambridge*, T. 5, p. 113, 1905.
- DINEUR. — *Acad. roy. de Med. de Belgique*, p. 652, 1898.
- DREYER et DOUGLAS. — *Proc. Roy. Soc.*, T. 82, p. 168, 1910.
- DUBRISAY (R.). — *Mem. des Sc. phys.*, fasc. 8, 48 p., 1929.
- EISENBERG (Ph.). — *Bull. Ac. Crac.*, p. 289, 1902; *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Bd. 34, p. 739, 1903; Bd. 41, p. 358, 1906.
- EISENBERG (Ph.) et VOLK (R.). — *Zeitschr. f. Hyg.*, Bd. 40, p. 155, 1902.
- FALK (I.-S.) et HARRISSON (R.-W.). — *Journ. Bact. Baltimore*, T. 13, p. 97, 1926.
- FABRY (P.) et MALVOZ (E.). — *C. R. Soc. biol.*, T. 85, p. 237, 1931.
- FIELD (C.-W.) et TEAGUE (O.). — *Journ. exper. med.*, T. 9, p. 86, 1907.
- FLEMMING (A.). — *British Journ. of path.*, T. 9, p. 231-235, 1928.
- FREUNDLICH (H.). — *Zeitschr. f. physik. Chem.*, Bd. 57, p. 385, 1906; *Kapillarchemie*, Leipzig, 1922; in R. H. Bogue, *Traité de chimie colloïdale*, T. I, Hermann, Paris, p. 300, 1928.
- GAEHTGENS (W.). — *Zeitschr. f. Immunitätsforsch.*, Bd. 55, p. 314, 1928.
- GAEHTGENS (W.) et KAMM. — *Munch. med. Wochenschr.*, p. 1389, 1910.
- GATES (F.-L.). — *Journ. exper. Med.*, T. 35, p. 63, 1922.
- GENGOU. — *Arch. intern. de Pharm. et de Thérap.*, T. 6, p. 289, 1899; *Ann. Inst. Past.*, T. 18, p. 678, 1904.
- GEORGIEVICS. — *Monatsch. f. Chem.*, Bd. 34, p. 733, 1913.
- GIRARD (P.). — *C. R. Soc. biol.*, T. 84, p. 442, 1921.
- GIRARD (P.) et AUDUBERT (R.). — *C. R. Acad. Sc.*, T. 167, p. 351, 1918.
- GOVAERTS (P.). — *C. R. Soc. biol.*, T. 38, p. 993, 1923.
- GOYLE (A.-N.). — *Journ. Path. and Bact.*, T. 30, p. 331, 1927.
- GRUBER (M.) et DURHAM. — *Wien. klin. Wochenschr.*, n° 11-12, p. 183 et 201, 1896.

- HARKINS (W.) — in R. H. Bogue, *Traité de Chimie colloïdale*, T. I, Hermann, Paris, p. 137-173, 1928.
- HEITZ (J.). — *Thèse Pharmacie*, Nancy, 268 pages, 1920.
- HENRI (V.). — *Cours de Chimie physique*, 1^{er} fasc., Hermann, Paris, 1906.
- HENRI (V.), LALOU (S.), MAYER (A.) et STODEL (G.). — *C. R. Soc. biol.*, T. 56, p. 1606, 1613, 1668, 1669-1671, 1903.
- HEUER (G.). — *Zeitschr. f. Hyg.*, Bd. 95, p. 100, 1922.
- HIRSCH (E.-F.). — *Journ. Infect. Dis.*, Chicago, T. 30, p. 651-657, 1922.
- JOBLING. — *Zeitschr. f. Hyg.*, Bd. 53, p. 154, 1906.
- JONES (T.-S.). — *Journ. exper. Med.*, T. 46, p. 291, 1927.
- JOOS (A.). — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Bd. 33, p. 762, 1903.
- KOPACZEWSKI (W.) — *Arch. phys. biol.*, T. I, p. 145, 1921.
- KOPACZEWSKI (W.) et REQUIN (J.). — *Arch. phys. biol.*, T. II, p. 1, 1922.
- KRAUS et JOACHIM. — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Bd. 36, p. 662, 1903; Bd. 37, p. 73, 1903.
- KRAUS et SENG. — *Wien. klin. Wochenschr.*, Bd. 12, p. 1, 1899.
- DE KRUIF et NORTHROP. — *Journ. Gen. Physiol.*, T. 5, p. 127-138, 139-142, 1922-1923.
- LASSEUR (Ph.) et THIRY (G.). — *Revue med. Est.*, T. 49, p. 674, 713, 1913.
- LASSEUR (Ph.) et SPILLMANN (L.). — *Réactions anticorps*, fasc. I, 215 pages, Imprimeries Réunies, Nancy, 1921.
- LASSEUR (Ph.) et JOUFFROY (P.). — *Trav. Laborat. Microbiol.*, Faculté Pharmacie, Nancy, fasc. I, p. 13-34, 89-94, 109-110, 115-122, 123-124, 1928.
- LASSEUR (Ph.), JOUFFROY (P.) et DUPAIX (A.). — **Trav. Laborat. Microbiol.*, Faculté Pharm., Nancy, fasc. I, p. 95-98, 98-104, 1928.
- LASSEUR (Ph.) et FRIBOURG (R.). — *Trav. Laborat. Microbiol.*, fasc. I, p. 35-46, 1928; fasc. II, p. 81-83, 1929.
- LASSEUR (Ph.), FRIBOURG (R.), OLIVIER (M.) et DUPAIX (A.). — *Trav. Laborat. Microbiol.*, fasc. II, p. 51-57, 1929.
- LASSEUR (Ph.), FRIBOURG (R.), DUPAIX (A.), LECAILLE (R.) et SERRA (J.). — *Trav. Laborat. Microbiol.*, fasc. III, p. 161-178, 1930.
- LASSEUR (Ph.) et NOBLAT (A.-M.). — *Trav. Laborat. Microbiol.*, fasc. I, p. 47-56, 57-62, 63-86, 105-108, 111-114, 1928.
- LASSEUR (Ph.) et ZAHL (S.). — *Trav. Laborat.*, fasc. I, p. 87-88, 1928.
- LASSEUR (Ph.), HURIET (J.) et MOREL (M.). — *Trav. Laborat.*, fasc. I, p. 125-136, 1928.
- LASSEUR (Ph.) et MARTIN (P.). — *Trav. Laborat.*, fasc. I, p. 137-163, 1928.
- LASSEUR (Ph.) et DUPAIX (A.). — *Trav. Laborat.*, fasc. II, p. 7-34, 1929; *Archiv. f. Mikrobiol.*, Bd. I, Heft. I, p. 137-164, 1930; *Trav. Laborat.*, fasc. V, p. 161-192, 1932.
- LASSEUR (Ph.), MOREL (M.) et DUPAIX (A.). — *Trav. Laborat.*, fasc. II, p. 35-50, 1929.
- LASSEUR (Ph.) et LECAILLE (R.). — *Trav. Laborat.*, fasc. III, p. 179-189, 1930.
- LASSEUR (Ph.), DUPAIX (A.) et OLIVIER (M.). — *Trav. Laborat.*, fasc. IV, p. 139-210, 1931.
- LASSEUR (Ph.), DUPAIX (A.) et DOMBRAY (P.). — *Trav. Laborat.*, fasc. IV, p. 211-216, 1931.

- LASSEUR (Ph.), DUPAIX (A.) et GROJEAN (M.). — *C. R. Acad. Sc.*, T. 194, p. 495, 1932; *Trav. Laborat.*, fasc V, p. 151-160, 1932.
- LASSEUR (Ph.), VERNIER (P.), DUPAIX (A.) et MARCHAL (J.). — *C. R. Acad. Sc.*, T. 194, p. 1606-1608, 1932.
- LASSEUR (Ph.), VERNIER (P.) et DUPAIX (A.). — *Trav. Laborat.*, fasc. V, p. 143-150, 1932.
- LECAILLE (R.). — *Thèse Pharmacie*, Nancy. 1932.
- LECOMTE DU NOUY (P.). — *Equilibres superficiels des solutions colloïdales*, Paris, Masson, 1929.
- LOEWIT. — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, orig., Bd. 34, p. 156-166, 251-259, 1903.
- LORTET (L.). — *C. R. Acad. Sc.*, T. 122, p. 892-894, 1896.
- DI MACCOG. — *Arch. di Soc. biol. Napoli*, T. 3, p. 399, 1922.
- MADSEN (Th.) et SCHMIDT (S.). — *Ann. Inst. Past.*, T. 40, p. 300, 1926.
- MALVOZ (E.). — *Ann. Inst. Past.*, T. 11, p. 582, 1897; T. 13, p. 630, 1899.
- MANGIN (G.) et HENRI (V.). — *C. R. Soc. biol.*, T. 56, p. 38, 1904.
- MARTIN (P.). — *Thèse Pharmacie*, Nancy, 1930.
- MARTIN (R.). — *Thèse Pharmacie*, Nancy, 1930.
- MEISEL (H.). — *C. R. Soc. biol.*, T. CII, p. 87-89, 1929.
- MESNIL (F.). — *Ann. Inst. Past.*, T. 12, p. 490, 1898; *C. R. Soc. biol.*, T. 100, p. 266, 1929.
- MICHAELIS (L.). — *Biochem. Centralbl.*, Bd. 3, p. 693, 1904-1905; *Deutsch. Med. Wochenschr.*, Bd. 27, p. 969, 1911.
- MULLER (Th.). — *Munch. med. Wochenschr.*, p. 56, 1903.
- NEISSER et FRIEDMANN. — *Munch. med. Wochenschr.*, Bd. 51, p. 827, 1904.
- NICOLLE (Ch.). — *Ann. Inst. Past.*, T. 12, p. 161, 1898; *C. R. Soc. biol.*, T. 12, p. 1054, 1898; *Ann. Inst. Past.*, T. 18, p. 209, 1904.
- NOBLAT (A.-M.). — *Thèse Pharmacie*, Nancy, 1929.
- NORTHROP (J.-H.). — *Journ. Gen. Physiol.*, Baltimore, T. 5, p. 605, 1922-1923; in R. H. Bogue, *Traité de Chimie colloïdale*, T. I, p. 67-91, 1928.
- PALTAUF (R.). — *Handbuch d. pathog. Mikroorg.*, Kolle et Wassermann, Bd. 2, 1, p. 483, 1913.
- PIETTRE et CHRETIEN. — *C. R. Acad. Sc.*, T. 185, p. 1319-1321, 1927.
- PORGES (O.). — *Wien. klin. Wochenschr.* p. 691, 1905; *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Bd. 39, p. 319, 1905; Bd. 40, p. 133, 1905; *Zeitschr. f. experim. Path. u. Therap.*, Bd. I, p. 620, 1905.
- PORGES (O.) et PRANTSCHOFF. — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Bd. 41, p. 466, 546, 658, 1906.
- PORGES (O.) et SPIEGEL (A.). — *Handbuch d. path. Mikroorg.*, Kolle, Kraus u. Uhlenhuth, Bd. 1, 2, p. 1027, 1929.
- POSSELT et SAGASSER. — *Wien. klin. Wochenschr.*, Bd. 16, p. 691, 1903.
- PÖWIS (F.). — *Zeitschr. f. physik. Chem.*, Bd. 89, p. 186, 1900.
- RAMON (G.). — *C. R. Soc. biol.*, T. 86, p. 711, 813, 1922; T. 97, p. 538, 1927.
- ROCHAIX (A.), LE BOURDELÈS et BRUN (L.). — *C. R. Soc. biol.*, T. 100, p. 675, 1929.
- ROUSLACROIX et BOIRON (H.). — *C. R. Soc. biol.*, T. 108, p. 99 et 973, 1931.
- SACHS (H.) et RITZ (H.). — *Handbuch d. path. Mikroorg.*, Kolle et Wassermann, Bd. 3, p. 1, 1913.

- SADLER (K.) — *Berlin. klin. Wochenschr.*, Bd. 42, p. 225, 1905.
- SALIMBENI (T.). — *Ann. Inst. Past.*, T. 11, p. 277, 1897.
- SARTORY et LASSEUR (Ph.). — *Bull. Sc. Pharmacol.*, T. 22, p. 193-195, 1915.
- SCHELLER. — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. 1, Bd. 36, p. 427, 694, 1904.
- SHIBLEY (G.-S.). — *Journ. exper. med.*, T. 40, p. 453, 1924, T. 44, p. 667, 1926.
- SHIONOYA (T.). — *The Lancet, London*, T. 2, p. 905, 1922.
- SORU (E.). — *C. R. Soc. biol.*, T. C, p. 904-905, 1929; T. CI, p. 969-970, 1929; T. CIII, p. 635-637, 1930.
- SYNGE (V.-M.). — *Journ. Med. Sc.*, T. 149, p. 76, 1920.
- SZENT-GYORGYI. — *Biochem. Zeitschr.*, Bd. 113, p. 36, 1920.
- TEAGUE (O.) et BUXTON (B.-H.). — *Zeitschr. f. physik. Chem.*, Bd. 57, p. 64 et 76, 1907.
- THOMAS (A.-W.). — in R. H. Bogue, *Traité de Chimie colloïdale*, T. I, Hermann, Paris, p. 318, 319, 324, 1928.
- TRAMBUSTI (B.). — *Boll. dell. Instit. Sicroterap. Milanese*, T. 6, p. 183, 1927.
- TRAUBE (J.). — *Journ. de Chimie physique*, T. III, p. 583, 1905.
- WASSERMANN (A.). — *Zeitschr. f. Hyg.*, Bd. 42, p. 267, 1903.
- WEILL. — *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. I, Bd. 36, p. 677; Bd. 37, p. 98, 1904.
-

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

PREMIERE PARTIE

ÉTUDE MORPHOLOGIQUE ET BIOLOGIQUE DE *B. CARYOCYANEUS* BEIJERINCK-DUPAIX

1) BEIJERINCK a isolé du bois pourri d'un Saule des environs de Delft un Bacille produisant sur les milieux de culture une belle coloration bleue. Le savant hollandais nomma cette Bactérie *B. caryocyaneus* et la conserva dans sa collection sans publier aucune description à son sujet. Grâce à M. le Professeur KLUYVER, j'ai cependant eu connaissance de quelques observations (inédites) faites par BEIJERINCK sur la vie de ce germe chromogène.

2) Les plastides de *B. caryocyaneus* sont isolées ou associées en diplobacilles et en filaments. La longueur de ces dernières formations est très variable. Les longues files de plastides sont très rares, les chaînettes formées de 3 ou 4 éléments un peu plus fréquentes, tandis que les plastides isolées et les diplobacilles représentent la majorité de la population bactérienne.

3) Examiné sur le frais (en l'absence de coloration ou après coloration vitale), *B. caryocyaneus* se présente sous la forme d'un bâtonnet droit ou légèrement arqué. On peut distinguer deux types d'éléments, A et B, d'inégale fréquence. Le type A, dominant, est formé de diplobacilles constitués par deux troncs de cône ou deux cônes opposés par leur base. Les plastides du type B sont courtes, ovalaires et plus larges que les plastides du type A.

Dans les conditions habituelles de culture, les plastides de *B. caryocyaneus* sont entourées d'une auréole hyaline dont la visibilité dépend du milieu de culture et du milieu d'observation.

Cultivées dans des conditions défavorables et particulièrement en eau peptonée additionnée d'acide phénique, les plastides de *B. caryocyaneus* offrent des aspects différents de ceux que je viens de décrire. A côté de

plastides de dimensions supérieures à celles que l'on observe sur milieux normaux, on trouve des plastides extrêmement petites. Souvent, les deux éléments réunis en diplobacilles sont reliés entre eux par un pont de cytoplasme qui peut facilement passer inaperçu dans les cultures non additionnées d'antiseptique. En milieu phéniqué, l'auréole hyaline prend une grande importance.

L'acide phénique n'a pas le privilège exclusif de déterminer l'exagération de l'auréole. On obtient le même résultat par addition de chlorure de lithium au milieu de culture. Dans les milieux lithinés, cette formation prend une importance telle qu'il est possible de la colorer très facilement à l'aide de la Fuchsine formolée. On met ainsi en évidence une capsule magnifique. Avec le chlorure de lithium, on note en outre la présence de filaments dont certains très longs peuvent renfermer 10 ou 15 plastides. Les dimensions des plastides sont très différentes. On observe des éléments très courts presque ronds, d'autres ovalaires, puis des plastides allongées, enfin des formes géantes.

L'irrégularité de taille peut être déterminée et par les agents chimiques et par les agents physiques. Tel est l'exemple de la chaleur. Dans les cultures effectuées en milieu L₁ et à la température de 40° C., on rencontre non seulement des plastides isolées et des diplobacilles, mais encore des filaments constitués par 10 à 12 plastides. Là aussi, la zone hyaline, entourant chaque plastide, est très nette.

4) L'examen des différentes populations de *B. caryocyaneus* ne décèle jamais la présence de formes de résistance analogues à celles des Bactéries du groupe *subtilis* — *mesentericus* — *megatherium*.

5) Dans de nombreuses conditions d'observation on constate que les plastides de *B. caryocyaneus* sont limitées par une membrane. Le cytoplasme des corps microbiens montre une structure alvéolaire et vacuolaire. Pour observer ces images, il faut avoir recours à l'examen sur le frais soit sans coloration, soit après coloration vitale. En effet, la dessication et la fixation modifient profondément la structure des Bactéries.

B. caryocyaneus ne constitue pas un matériel très favorable à l'étude des granulations. Tout au plus, peut-on dire que les formations arrondies perçues à l'examen microscopique ou à l'examen ultramicroscopique ne sont constituées ni par de la graisse, ni par du glycogène.

6) *B. caryocyaneus* est un germe très mobile. La vitesse de son déplacement est intermédiaire entre celle du Vibrion cholérique et celle du Bacille typhique. En raison de sa viscosité, le liquide de peptonisation de l'albu-

mine constitue un milieu favorable à l'étude du mouvement vital de *B. caryocyaneus*. Les corps microbiens se déplacent suivant un mouvement combiné de translation et d'oscillations latérales. L'organe moteur est un fouet paraissant solidement fixé, car les fouets détachés sont très rares. Le fouet est très nettement mis en évidence par les méthodes d'imprégnation à l'argent. L'organe du mouvement présente 3 à 5 spires et sa longueur totale varie de $2\ \mu 5$ à $8\ \mu$. Certains éléments semblent posséder deux fouets; mais un examen approfondi montre l'existence d'une cloison de division, on a affaire à deux plastides accolées.

7) *B. caryocyaneus* est une Bactérie de taille moyenne. Pour la majorité des plastides la longueur oscille entre $2\ \mu$ et $3\ \mu 2$ et la largeur entre $0\ \mu 5$ et $0\ \mu 7$. La longueur peut atteindre les limites extrêmes de $0\ \mu 5$ et $4\ \mu 7$. L'étude de la variation du rapport $\frac{l}{l}$ (rapport de LASSEUR) montre un allongement des plastides à mesure que les cultures vieillissent.

8) *B. caryocyaneus* ne « prend pas le GRAM ». La vitesse de décoloration des plastides a été déterminée après coloration par des solutions de Violet de gentiane stabilisées. La stabilisation des solutions est fondée sur la protection due à la gélatine et sur le phénomène de BOUTARIC (apports répétés de petites doses d'acide phénique). Après 4 à 5 secondes d'action du décolorant (alcool à 95°), 100 % des plastides de *B. caryocyaneus* sont colorées en rouge. *Staphylococcus aureus*, pris comme test de décoloration, montre, après 60 minutes d'action du décolorant, 5 % seulement de plastides colorées en rouge.

9) La température optimum de culture est comprise entre 20 et 25° C. A 39 — 40° C., la végétation est tout d'abord lente et irrégulière. Cependant par passages successifs et sélection des tubes offrant le maximum de végétation, j'ai obtenu des souches se développant abondamment à 39 — 40° C. A cette température, *B. caryocyaneus* ne secrète plus aucun pigment. La perte du pouvoir chromogène coïncide avec une diminution de la vitalité des cultures, car, quelles que soient les précautions prises, les souches ne se sont plus développées après une cinquantaine de passages à 40° C.

10) *B. caryocyaneus* résiste assez mal à l'élévation de température. Toutes les cultures sont tuées après un séjour de 10 minutes à 56° C., ou de 4 minutes à 58° C.

11) L'oxygène libre est indispensable au développement et à la produc-

tion des corps colorés secrétés par *B. caryocyaneus*. On n'observe aucune végétation en l'absence rigoureuse d'oxygène. Cependant il faut remarquer qu'après 7 jours de séjour dans une atmosphère d'azote la Bactérie n'est pas tuée, il suffit de faire pénétrer aseptiquement de l'air dans le tube privé d'oxygène pour que *B. caryocyaneus* offre une végétation normale.

12) Les cultures de *B. caryocyaneus* dégagent une odeur putride très prononcée.

13) En bouillon ou en solution de peptone *B. caryocyaneus* produit un voile, un trouble et une fluorescence verte.

14) Sur gélose (en piqûres), *B. caryocyaneus* donne une culture blanc-grisâtre, présentant une fluorescence verte. A mesure que les cultures vieillissent, un pigment brun diffuse dans la gelée nutritive. Sur plaques de gélose, les colonies arrondies peuvent être ramenées aux trois types suivants : a) bombées, lisses ; b) à bord surélevé et centre plissé ; c) plates, très plissées.

15) En raison de l'intensité du pouvoir protéolytique, la culture de *B. caryocyaneus* sur plaque de gélatine ne fournit pas un élément de diagnose important.

16) *B. caryocyaneus* liquéfie rapidement la gélatine. La liquéfaction s'effectue d'abord en entonnoir, puis elle progresse par tranches. L'étude de la liquéfaction de la gélatine exige l'emploi de systèmes de pH déterminé. *B. caryocyaneus* exerce aussi une action protéolytique sur le sérum de Cheval coagulé et l'albumine d'œuf coagulée.

17) Les pommes de terre glycinées constituent un milieu très favorable à la végétation de *B. caryocyaneus* et à la production de la caryocyanine. Les tubercules se recouvrent d'un enduit luisant gris-bleu devenant noir cirage.

18) Sur carotte, la culture de *B. caryocyaneus* est gris noirâtre à reflets verts.

19) Cultivé sur lait, *B. caryocyaneus* donne une coloration gris-bleu et un voile bleu-noir surmontant la couche crémeuse non colorée. *B. caryocyaneus* ne coagule pas le lait ; mais son pouvoir protéolytique se manifeste par une peptonisation très intense. Le filtrat de vieilles cultures jouit de propriétés protéolytiques.

20) *B. caryocyaneus* ne fait pas virer le Rouge neutre.

21) Étudié comparativement avec le Colibacille, et quelle que soit la com-

position du milieu de culture, *B. caryocyaneus* est incapable de désintégrer le tryptophane pour en libérer l'indol.

22) *B. caryocyaneus* fait fermenter le xylose, l'arabinose, le glucose et le galactose. En ce qui concerne le glucose, l'acidification corrélative à la fermentation est suivie d'une alcalinisation du milieu.

23) *B. caryocyaneus* réduit les nitrates en nitrites. En solution peptonée additionnée ou non de soufre, *B. caryocyaneus* provoque un dégagement d'hydrogène sulfuré. Le pouvoir réducteur de *B. caryocyaneus* se manifeste aussi sur le Bleu de Nil.

24) Sur milieu synthétique L_1 , *B. caryocyaneus* détermine l'apparition d'une magnifique fluorescence verte. On note, en outre, la formation d'un pigment bleu (caryocyanine) dont l'intensité augmente avec le temps, de telle façon que la fluorescence verte est masquée. Le liquide coloré en bleu intense montre par transparence une coloration violet-rouge.

25) Le phosphore est indispensable au développement de *B. caryocyaneus*. Une teneur de 2,5 ou 5 mmgr. de phosphate dipotassique pour 100 cm³ de milieu est incapable d'assurer un développement appréciable de *B. caryocyaneus*. A la dose de 10 mmgr., la végétation est irrégulière et les cultures sont tantôt incolores, tantôt légèrement fluorescentes. Par contre, une concentration de 50 mmgr. suffit pour provoquer l'apparition d'une belle fluorescence verte dont l'intensité est supérieure à celle que l'on observe avec les milieux renfermant 500 mmgr. de phosphate dipotassique.

26) Les milieux non additionnés de magnésium ne permettent pas à la fonction chromogène de se manifester. Dans les milieux additionnés tardivement de solution de sulfate de magnésium, on assiste à la formation du pigment fluorescent vert. Les cultures effectuées en présence de 1 à 2 mmgr. de chlorure de magnésium présentent une coloration jaune non fluorescente. Dans de telles cultures, il est possible de faire apparaître presque instantanément la fluorescence verte par l'apport de cations convenables.

27) En milieu L_1 non additionné de fer, *B. caryocyaneus* offre un développement plus faible qu'en milieu synthétique L_1 complet; mais chose plus importante, en l'absence de ce métal, on n'observe jamais la coloration bleu-violet à laquelle *B. caryocyaneus* doit son nom. L'apport tardif de fer en quantité extrêmement faible à des cultures effectuées en « milieu sans fer » provoque l'apparition du pigment bleu-violet. Si on substitue le manganèse, le nickel ou le chrome au fer dans le milieu L_1 on n'assiste pas à la formation de caryocyanine.

Le mécanisme d'action du fer dans la chromogénèse est généralement très complexe. En ce qui concerne *B. caryocyaneus*, l'ordre de grandeur des concentrations actives fait songer aux actions catalytiques.

28) La glycérine paraît indispensable à la production de la caryocyanine et à une végétation active.

29) Lorsqu'on cultive *B. caryocyaneus* dans des milieux synthétiques de pH croissants, on constate que cette Bactérie offre une zone de croissance assez large. Le maximum de fluorescence s'observe dans les milieux de pH initial égal à 7.2 et c'est dans les milieux de pH initial égal à 6 que l'on obtient la plus grande production de caryocyanine.

30) *B. caryocyaneus* alcalinise le milieu dans lequel il se développe.

31) Les plastides bactériennes semblent généralement incolores, sauf dans les vieilles cultures où l'on peut observer quelques éléments légèrement verdâtres et des plastides présentant des grains colorés en brun. Examinées sous une épaisseur de plusieurs centimètres (culot de centrifugation d'une culture sur milieu L_2), les plastides paraissent colorées en bleu foncé ou noir.

32) La soie est colorée par la caryocyanine à l'état naissant (fils de soie introduits dans une culture sur milieu L_2). De même, le protoplasme des cellules d'*Endomyces albicans* apparaît coloré en bleu-vert dans les cultures mixtes *B. caryocyaneus* + *Endomyces albicans*.

33) Toute tentative d'extraction de la caryocyanine a échoué.

34) La filtration sur bougie de cultures de *B. caryocyaneus* effectuées sur milieu L_2 donne un liquide bleu. L'addition d'ammoniaque ou de potasse au filtrat provoque la formation d'un précipité et l'apparition d'une coloration verte. L'addition ultérieure d'acide chlorhydrique fait disparaître le précipité et le liquide devient bleu puis rapidement gris-ardoisé.

Sous l'action de l'hydrogène naissant (zinc + acide chlorhydrique), la coloration bleue disparaît graduellement, elle n'est pas rétablie par une oxydation ménagée ultérieure. On obtient en effet une légère coloration violet-brun.

35) Les solutions de caryocyanine offrent une absorption sélective dans le spectre visible. Le maximum d'absorption de FORMANEK-GRANDMOUGIN est à $\lambda = 588,5$.

36) Cultivé en présence d'acide phénique, *B. caryocyaneus* se développe normalement tant que la concentration en antiseptique ne dépasse pas 0 gr. 25 o/oo. Toute végétation est suspendue pour une teneur de

0 gr. 75 0/00 et les plastides sont tuées lorsque la concentration atteint 2 gr. 0/00.

37) Dans les cultures effectuées en eau peptonée additionnée de Bleu de Nil, on constate que le développement est irrégulier lorsque la teneur en colorant est de 0 gr. 208 % (concentration critique). La concentration infertilisante est de l'ordre de 0 gr. 250 % et la concentration mortelle est voisine de 0 gr. 500 %.

38) L'Erythrosine s'est montrée dénuée de tout pouvoir toxique vis-à-vis du germe que j'étudie.

39) La culture de *B. caryocyaneus* en milieu additionné de Bleu de Nil ou d'Erythrosine permet de déceler certains détails de structure qui sont peu visibles ou passent même inaperçus à l'aide des méthodes de coloration usuelles.

40) Dans une culture mixte de *B. caryocyaneus* et d'*Endomyces albicans*, il est possible de faire dominer l'un ou l'autre des éléments microbiens par addition d'ions convenables au milieu nutritif.

41) *B. caryocyaneus* est particulièrement sensible à l'action bactéricide de l'argent métallique. Les résultats varient avec la forme donnée aux dispositifs métalliques. Ces différences d'action des dispositifs métalliques tiennent à l'inégale répartition du métal au sein de la suspension.

L'hypothèse physique de LAKHOVSKY ne rend pas compte des faits observés. L'action bactéricide de l'argent pourrait s'expliquer par plusieurs processus simultanés ou successifs parmi lesquels on peut citer :

a) fixation de plastides bactériennes à la surface de l'argent (adsorption, ou adhésion au sens de BECHHOLD et REINDERS).

b) solubilisation du métal.

42) *B. caryocyaneus* est dénué de tout pouvoir pathogène pour le Lapin, le Cobaye, la Souris et la Grenouille; par contre les larves de *Galleria mellonella* sont très sensibles à l'inoculation de *B. caryocyaneus*.

B. caryocyaneus paraît dépourvu de virulence pour *Begonia*, *Geranium*, *Pelargonium* et *Opuntia*.

43) L'obtention de sérums agglutinants ne présente aucune difficulté.

B. caryocyaneus est doué d'un pouvoir antigène très élevé. La dilution limite d'agglutination des sérums d'animaux préparés est de l'ordre du 1/100.000.

44) Sous l'action du sérum homologue, les plastides se réunissent en amas peu compacts. Pour les fortes concentrations en sérum, on n'observe que des amas gros ou moyens. Mais pour une large zone de dilution de

l'ordre de 1/50.000 au 1/80.000 on constate, à côté de nombreux amas moyens et petits, des plastides isolées en nombre important. Pour expliquer ce fait, on peut faire appel soit à la notion de biotypes, soit à celle de réaction limitée au sens de MADSEN-ARRHENIUS.

45) Le chauffage à 80° C. augmente considérablement la stabilité des suspensions de *B. caryocyaneus*.

46) Lorsque la concentration en corps microbiens des systèmes agglutinants varie de 1 à 16, la marche de l'agglutination n'est pas notablement modifiée.

47) Dans la limite où la réaction du milieu permet la végétation de *B. caryocyaneus*, les variations du pH des milieux de culture (de l'ordre de pH = 5,5 à pH = 8) n'influencent pas sensiblement l'allure de l'agglutination sérique des plastides.

48) La culture en milieu phéniqué provoque une chute importante de l'agglutinabilité de *B. caryocyaneus*, contrairement aux faits observés avec certaines espèces bactériennes.

49) Les corps microbiens cultivés sur gélose lithinée (pourvus d'une capsule très développée) sont beaucoup moins sensibles à l'action du sérum agglutinant que les germes récoltés sur gélose ordinaire.

50) Les plastides provenant de milieu lithiné sont par contre facilement précipitables par les ions H⁺ et Al⁺⁺⁺.

51) La perméabilité de la membrane des plastides cultivées sur gélose ordinaire est plus grande que celle des plastides récoltées sur gélose additionnée de chlorure de lithium.

52) Le type normal de *B. caryocyaneus* possède un pouvoir agglutinogène plus élevé que la modification fluorescente ou la race achromogène de ce germe.

53) Les diverses souches de la même race peuvent offrir des agglutinabilités différentes.

54) Le sérum de Lapin préparé avec *B. caryocyaneus* a la propriété d'agglutiner à un taux assez élevé (1/800) *B. chlororaphis* et à un taux plus faible (1/100) le « *Bacille fluorescent liquéfiant* de CHAMPEN » et le « *Bacille fluorescent liquéfiant* HIRBQUELLWASSER ».

55) La réaction de CASTELLANI montre que la saturation de l'agglutinine — *B. caryocyaneus* par les plastides de *B. caryocyaneus* fait disparaître le pouvoir agglutinant du sérum pour *B. caryocyaneus* et *B. chlororaphis*. De plus, il semble que les plastides de *B. chlororaphis* mises au contact du

sérum B. caryocyaneus fixent une partie de l'agglutinine — *B. caryocyaneus*.

56) L'inoculation simultanée de *B. caryocyaneus*, *B. pyocyaneus* var. *pyocyanogenes* et *B. chlororaphis* permet d'obtenir un sérum agglutinant *B. pyocyanus* à un taux beaucoup plus élevé que le sérum des animaux préparés avec *B. pyocyaneus* seul. Par contre, la production d'agglutinines se trouve diminuée pour *B. caryocyaneus* et *B. chlororaphis*.

57) Le suc des plants d'*Opuntia* inoculés avec *B. caryocyaneus* n'agglutine pas les plastides de *B. caryocyaneus*. L'absence d'agglutination ne démontre pas l'incapacité de cette plante à produire des anticorps. L'agglomération caractéristique des plastides peut faire défaut par suite de stabilisation due à des causes diverses.

58) Il existe une disproportion très nette entre le pouvoir agglutinant et le pouvoir sensibilisant du sérum *B. caryocyaneus*. Cependant le complexe fixateur anticorps-antigène *B. caryocyaneus* doit être rangé dans la catégorie des complexes offrant une grande avidité pour l'alexine.

59) *B. chlororaphis* ne fixe pas l'alexine en présence de sensibilisatrice — *B. caryocyaneus*.

60) Pour étudier la variabilité des Bactéries, il est nécessaire d'opérer sur des cultures issues d'une seule plastide. Le dispositif utilisé dans mes recherches permet d'isoler une seule plastide et de suivre son développement au microscope.

61) Il ne faut pas considérer comme variation les modifications morphologiques ou physiologiques observées sous l'influence de certains agents. A un facteur déterminé, la Bactérie répond par une réaction donnée.

62) Par passages répétés sur milieu synthétique L_1 et ensemencements dès l'apparition du pigment fluorescent vert, j'ai pu obtenir une race dégradée, exclusivement fluorescente. Des isollements à partir d'une seule plastide ont été effectués sur cette race fluorescente. Les souches ainsi obtenues ne produisent plus de caryocyanine; mais l'ensemble de leurs caractères morphologiques physiologiques et sérologiques n'est pas sensiblement modifié.

63) Par cultures répétées à 40° C. et sélection des cultures présentant le maximum de végétation, on obtient une race achromogène de *B. caryocyaneus* se développant très abondamment à 40° C. Cette race a conservé toutes les propriétés antigènes du type normal.

64) *B. caryocyaneus* sécrétant une matière fluorescente verte et un pig-

ment bleu, on est tenté de le rapprocher d'une part des Bactéries fluorescentes et d'autre part des Bactéries chromogènes bleues.

L'examen des caractères morphologiques, cultureux et sérologiques, permet de différencier *B. caryocyaneus* des germes qui lui ressemblent le plus tels que *B. cyaneo-fluorescens* ZANGEMEISTER 1895, le Bacille bleu isolé de l'air et décrit par MILDENBERG (1922), et *B. pyocyaneus* GESSARD 1882. La Bactérie que j'étudie est donc bien une espèce bactérienne nouvelle.

65) L'agglutination décèle une parenté humorale: 1° entre *B. caryocyaneus* et *B. chlororaphis*; 2° entre *B. caryocyaneus* et deux Bactéries fluorescentes; le « *Bacille fluorescent liquéfiant* de CHAPMEN » et le « *Bacille fluorescent liquéfiant* HIRBQUELLWASSER ».

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHES SUR LE MÉCANISME DU PHÉNOMÈNE DE CHARRIN ET ROGER

(Agglutination sérique des Bactéries)

1) Esquissé le 4 novembre 1889 par CHARRIN et ROGER, l'agglutination sérique du Bacille pyocyanique a été précisée par ces mêmes auteurs le 23 novembre 1889.

2) L'agglutination des plastides sous l'influence de leur sérum homologue doit, en toute justice, porter le nom de phénomène de CHARRIN et ROGER.

3) La stabilité des suspensions bactériennes est sous la dépendance de nombreux facteurs.

En premier lieu, il faut considérer le mouvement brownien et le mouvement vital. L'intensité de ces deux mouvements varie avec les dimensions, l'âge des plastides, la viscosité, la température, la réaction du milieu, etc... Ces facteurs sont insuffisants pour expliquer la stabilité temporaire des suspensions bactériennes.

4) Les plastides bactériennes lavées et mises en suspension dans l'eau distillée sont chargées négativement.

5) La répulsion due à la charge électrique des plastides maintient les corps microbiens en suspension, mais des forces antagonistes (tension superficielle, tension interfaciale, force d'attraction capillaire) tendent à rapprocher les éléments bactériens isolés.

6) La viscosité du milieu s'oppose à l'agglomération des plastides en diminuant leur vitesse de déplacement.

7) La fixation de l'anticorps sur l'antigène peut être ramenée à un phénomène d'adsorption. L'orientation des molécules adsorbées rend compte de la spécificité de la réaction.

8) Quels que soient la nature du milieu nutritif utilisé et l'âge des cultures examinées, les plastides de *B. caryocyaneus* mises en suspension dans l'eau distillée sont chargées négativement.

9) L'agglutination des plastides de *B. caryocyaneus* par les ions H^+ et par le Rouge neutre a lieu avant le point isoélectrique.

10) L'agglutination sérique de *B. caryocyaneus* a lieu avant le point isoélectrique.

11) La vitesse de transport du complexe *anticorps-antigène* diminue à mesure que croît la concentration des systèmes en chlorure de sodium.

12) Les plastides de *B. caryocyaneus* et de *B. chlororaphis* ne sont pas agglutinées par leur sérum homologue lorsque le pH des systèmes agglutinants est de l'ordre de $pH = 2$ ou $pH = 2,5$.

13) L'agglutination de *B. caryocyaneus* débute vers $pH = 4$ et celle de *B. chlororaphis* commence aux environs de $pH = 3$.

14) Les plus hautes dilutions limites d'agglutination s'observent de $pH = 4,78$ à $pH = 6,30$ pour *B. caryocyaneus* et de $pH = 4,75$ à $pH = 8,38$ pour *B. chlororaphis*.

15) Dans l'étude du pH sur la marche de l'agglutination, il faut tenir compte de certaines complications. Dans mes expériences, la variation du pH est corrélative à une variation de la concentration en électrolytes. De plus, les pH élevés coïncident avec un éclaircissement considérable des suspensions. Cette diminution d'opacité est due à l'hydratation et à la peptisation des plastides bactériennes.

16) Lorsqu'on ajoute des concentrations croissantes en ions H^+ à une suspension de plastides de *B. caryocyaneus*, on observe une diminution de volume des corps microbiens de $pH = 6,90$ à $pH = 3,6$. A partir de ce minimum, le volume croît jusqu'à $pH = 2,54$. Dans la zone des pH com-

prise entre $\text{pH} = 6,90$ et $\text{pH} 8,30$, le volume des plastides décroît à mesure que diminue la concentration en ions H^+ .

17) Les plastides de *B. caryocyaneus* additionnées de sérum de Lapin normal (chauffé 30 minutes à 56°C.) offrent un minimum de volume à $\text{pH} = 3,6$, un maximum de gonflement à $\text{pH} = 6$, puis le volume décroît de $\text{pH} = 6$ à $\text{pH} = 7$, pour croître à nouveau à partir de $\text{pH} = 7$.

18) En présence ou en l'absence de sérum d'animaux non préparés la courbe représentant la variation de volume a sensiblement la même allure de $\text{pH} = 2$ à $\text{pH} = 6$; mais à partir de cette concentration en ions H^+ , les courbes offrent des aspects différents.

19) La variation de gonflement des plastides de *B. caryocyaneus* sous l'action du pH ne constitue pas une anomalie. Les plastides de *B. prodigiosus* se comportent d'une façon analogue sous l'action des ions H^+ .

20) Sous l'influence du pH , la variation de volume du complexe *anti-corps-antigène* *B. caryocyaneus* montre elle aussi un minimum de volume à $\text{pH} = 3,5$; mais le maximum de gonflement s'observe à $\text{pH} = 8,36$, puis le volume décroît à mesure que croît la concentration en ions OH^- .

21) Lorsqu'on étudie le rôle du pH dans la variation de volume des plastides bactériennes, il y a lieu d'envisager une nouvelle cause d'erreur: l'influence de la composition de la solution tampon.

22) Pour la zone de pH comprise entre $\text{pH} = 3,5$ et $\text{pH} = 4,25$, le volume des plastides augmente lorsqu'on utilise les solutions tampons de Mac ILVAINE (phosphate disodique + acide citrique) tandis qu'il diminue lorsque la solution tampon est composée de citrate de soude et d'acide chlorhydrique.

23) La marche de l'agglutination peut être elle aussi influencée par la nature électrolytique de la solution tampon.

24) *B. chlororaphis* et *B. caryocyaneus* ne se comportent pas toujours de la même façon vis-à-vis de toutes les solutions tampons expérimentées.

25) Sous l'influence du chauffage à 80°C. , un grand nombre de Bactérie perdent partiellement ou complètement la faculté d'être agglomérées, floclées ou précipitées par leur sérum homologue. Les suspensions de *B. caryocyaneus* qui ont été portées à cette température restent complètement insensibles à l'action précipitante du sérum homologue.

26) La stabilité remarquable des suspensions de *B. caryocyaneus* chauffées à 80°C. s'explique au moins partiellement, par un abaissement de la

tension superficielle des systèmes dispersés, une augmentation de la charge électrique des plastides et un accroissement de la viscosité des suspensions.

27) L'agglutination sérique de *B. caryocyanus* coïncide avec un abaissement de la différence de potentiel (D. P.) et de la tension superficielle.

28) L'addition de sérum agglutinant, même à la dilution de 1/1000, détermine une chute de la tension superficielle du système agglutinant. Cet abaissement très rapide, précède toujours la formation des précipités.

29) Les variations de charge électrique des plastides sont toujours rapides, mais il semble que l'on puisse considérer deux stades: a) abaissement instantané ou pratiquement instantané de la D. P. jusqu'à une certaine valeur variable avec les systèmes considérés; b) abaissement plus lent de la D. P. atteignant une valeur limite.

30) L'agglutination ayant lieu avant le point isoélectrique, il est logique de parler de différence de potentiel critique. Mais ce n'est là qu'une première approximation.

Il n'y a pas une différence de potentiel critique, mais des D. P. critiques dont les valeurs varient avec les systèmes considérés. Deux systèmes abaissés à la même D. P. peuvent être l'un agglutiné et l'autre formé de plastides isolées.

31) Avec le sérum normal et sans qu'il y ait agglutination, on détermine des abaissements de tension superficielle absolument du même ordre que ceux réalisés par le sérum agglutinant.

32) Par addition de substances tensio-actives (oléate de soude et sels biliaires) il est possible de stabiliser les suspensions bactériennes au point de les rendre insensibles à l'action précipitante du sérum homologue, du moins pour une concentration donnée en sérum agglutinant.

33) La stabilisation par addition de taurocholate, de glycocholate et d'oléate de soude aux systèmes agglutinants est due à l'abaissement de la tension superficielle et à l'hydratation corrélative des plastides bactériennes.

34) Dans les essais de stabilisation par l'oléate de soude l'action des ions OH— peut s'ajouter à celle de la tension superficielle; mais ce facteur ne joue aucun rôle dans la stabilisation des systèmes réalisés par le taurocholate et le glycocholate de soude.

35) La D. P., la tension superficielle, la viscosité et le pH ne suffisent pas à expliquer tous les phénomènes observés dans l'agglutination sérique des Bactéries.

BIBLIOGRAPHIE

Littérature générale

- ARTHUS (M.). — *De l'anaphylaxie à l'immunité*, Masson, Paris, 361 pages, 1921.
- BARY (P.). — *Les colloïdes*, Dunod, Paris, 508 pages, 1921.
- BOGUE (R.-H.). — *Traité de chimie colloïdale*; traduction J. BARBAUDY, T. I, Hermann, Paris, 438 pages, 1928.
- BOHN (G.) et DRZEWINA (A.). — *La Chimie et la vie*, Flammarion, Paris, 275 pages, 1920.
- BORDET (J.). — *Traité de l'immunité*; Masson, Paris, 720 pages, 1920.
- BOREL (E.). — *Le Hasard*, Alcan, Paris, 289 pages, 1928.
- BOUTARIC (A.). — *Les colloïdes et l'état colloïdal*, Alcan, Paris, 258 pages, 1931.
- BOUTROUX (E.). — *De la contingence des lois de la nature*, Alcan, Paris, 170 pages, 1929.
- BRACHET (A.). — *L'œuf et les facteurs de l'ontogénèse*, Doin, Paris, 344 pages, 1917.
- BRACHET (A.). — *La Vie créatrice des Formes*, Alcan, Paris, 200 pages, 1927.
- BURTON (E.-F.). — *The physical properties of colloïdal solutions*; 2^e édit., Longmans Green and C^o, 136 pages, 1921.
- DANKWORT (P.-W.). — *Lumineszenz-Analyse*; Akademische Verlagsgesellschaft, M. B. H., Leipzig, 147 pages, 1929.
- CALMETTE (A.). — *L'infection bacillaire et la tuberculose*; Masson, Paris, 615 pages, 1920.
- CAMPBELL (N.-R.). — *Les principes de la physique*, Alcan, Paris, 200 pages, 1923.
- CAULLERY. — *Le parasitisme et la symbiose*; Doin, Paris, 400 pages, 1922.
- CLARK (W.-M.). — *The determination of Hydrogen Ions*, 2^e edit., Baltimore, Williams and Wilkins Company, 480 pages, 1923.
- CUÉNOT (L.). — *La genèse des espèces animales*; Alcan, Paris, 2^e édition, 1921.
- Conférences faites au Laboratoire de Microbiologie*: DARMOIS, DUFOUR, TRAVERS, VAVON, PIERRET, COLLIN, GUINIER, GAIN, NÈGRE, PATRIAT, VITU (fasc. I, 1930); LECOMTE DU NOUY (fasc. II, 1931); METALNIKOV (fasc. III, 1931); BOUTARIC (fasc. IV, 1931); MAGROU (fasc. V, 1932).
- DUCLAUX (J.). — *La chimie et la matière vivante*, Alcan, Paris, 283 pages, 1920.
- DUCLAUX (J.). — *Les colloïdes*, Gauthier-Villars, 1^{re} édit., 288 pages, 1920; 2^e édit., 305 pages, 1922.
- ENRIQUES (F.). — *Les concepts fondamentaux de la science*, Flammarion, Paris, 311 pages, 1919.
- GELLHORN (E.). — *Das Permeabilitätsproblem*, Julius Springer, Berlin, 441 pages, 1929.
- GÉNIN (G.). — *Osmose, dialyse, ultrafiltration*, Dunod, Paris, 1928.
- GUNTZ (A.-A.). — *Etude sur les sulfures de zinc phosphorescents*; Thèse Sciences, Paris, 155 pages, 1925.

- GUYE (Ch.-É.). — *L'évolution physico-chimique*, Chiron, Paris, 112 pages, 1922.
- HAUDUROY (P.). — *Les ultravirus*; Masson, Paris, 392 pages, 1929.
- HENRI (V.). — *Chimie physique*, Hermann, Paris, 1906.
- HÖBER (R.). — *Physikalische Chemie der Zelle und der gewebe*, Wilhelm Engelmann, Leipzig, 1922.
- JAMES (W.). — *Philosophie de l'expérience*, Flammarion, Paris, 368 pages, 1928.
- JENNINGS (H.-S.). — *Vie et Mort*, Alcan, Paris, 275 pages, 1927.
- KOPACZEWSKI (W.). — *Traité de Biocolloïdologie*, T. I, fasc. I, p. 1-166; fasc. 2, p. 167-360; fasc. 3, p. 361-528; fasc. 4, p. 529-786; Gauthier-Villars, Paris, 1930.
- LANGEVIN (P.). — *L'orientation actuelle de la physique*, in *L'orientation actuelle des sciences*, Alcan, Paris, 1930.
- LAPICQUE (L.). — *L'orientation actuelle de la physiologie*, in *L'orientation actuelle des sciences*, Alcan, Paris, 1930.
- LASSEUR (Ph.). — *La notion quantitative en microbiologie*; *Bull. Sc. pharmacolog.*, T. XXX, p. 219, 1923.
- LASSEUR (Ph.) et SPILLMANN (L.). — *Réactions anticorps*; fasc. I, 215 pages, Imprimeries Réunies, Nancy, 1921.
- LE CHATELIER (H.). — *Science et Industrie*, Flammarion, Paris, 279 pages, 4^e mille.
- LECOMTE DU NOUY (F.). — *Equilibres superficiels des solutions colloïdales*, Paris, Masson, 1929.
- LECORNU (L.). — *La Mécanique, les idées et les faits*, Flammarion, Paris, 304 pages, 1922.
- LE DANTEC (F.). — *La « mécanique » de la vie*, Flammarion, Paris, 192 pages, 1919.
- LOEB (J.). — *La conception mécanique de la vie*, Alcan, Paris, 302 pages, 1914.
- LOEB (J.). — *Les Protéines*, Alcan, Paris, 242 pages, 1924.
- LOEB (J.). — *La théorie des phénomènes colloïdaux*, Alcan, Paris, 292 pages, 1925..
- LUMIÈRE (A.). — *Théorie colloïdale de la biologie*, Chiron, Paris, 202 pages 1922. *Théorie colloïdale de la vie et de la maladie*, Sézanne, Lyon, 47 pages, 1925.
- MAGROU (J.). — *Action à distance et Embryogénèse*; conférence faite au Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy, fascicule V, 14 pages, 1933.
- MARCHAL (J.-G.). — *Variation et Mutation en Bactériologie*; Le François, Paris, 304 pages, 1932.
- MARTINET (J.). — *Couleur et constitution chimique*; Cours professé à la Faculté des Sciences de Besançon, rédigé avec la collaboration de Mlle Alexandre; Doin, Paris, 1924.
- METZ (A.). — *Une nouvelle philosophie des sciences*, Alcan, Paris, 211 pages, 1928.
- NAGEOTTE (J.). — *L'organisation de la matière dans ses rapports avec la vie*, Alcan, Paris, p. 104-140, 1922.
- NICOLLE (M.). — *Les antigènes et les anticorps*, Masson, Paris, 1920.

- NICOLLE (M.) et BOQUET (A.). — *Eléments de Microbiologie générale et d'immunologie*; 2^e édit., Doin, Paris, 358 pages, 1926.
- NICOLLE (M.), CESARI (E.) et JOUAN (C.). — *Toxines et antitoxines*, Masson, Paris, 123 pages, 1919.
- NICOLLE (M.) et MAGROU (J.). — *Les maladies parasitaires des plantes*, Paris, Masson, 1922.
- OSTWALD (W.). — *Manipulations de chimie colloïdale*; traduction E. VELLINGER; Gauthier-Villars, Paris, 201 pages, 1924.
- PEREZ (Ch.). — *Quelques aspects de la Biologie*, in L'orientation actuelle des Sciences, Alcan, Paris, 1930.
- PERRIN (F.) et PERRIN (J.). — *Activation et désactivation par induction moléculaire*; in Réunion internationale de Chimie physique. Activation et structure des molécules, p. 354-382, Presses Universitaires, Paris, 1929.
- PERRIN (J.). — *Les atomes*, Alcan, Paris, 1920.
- PERRIN (J.). — *La chimie physique*, in L'orientation actuelle des Sciences, Alcan, Paris, 1930.
- PICARD (E.). — *La science moderne et son état actuel*, Flammarion, Paris, 313 pages, 1921.
- PLANTEFOL (L.). — *La Biologie végétale*, in L'orientation actuelle des sciences, Alcan, Paris, 1930.
- POINCARÉ (H.). — *Science et méthode; La science et l'hypothèse*, Flammarion, Paris, 1900.
- RABAUD (E.). — *Le transformisme et l'expérience*, Alcan, Paris, 315 pages, 1911.
- RABAUD (E.). — *L'adaptation et l'évolution*, Chiron, Paris, 1922.
- RIGNANO (E.). — *Qu'est-ce que la vie ? Nouveaux essais de synthèse biologique*, Alcan, Paris, 208 pages, 1926.
- ROMAN (E.). — *Le Bacille tuberculeux, polymorphisme, position systématique*, Edit. du service photographique de l'Université, Lyon, 1930.
- STELLING-DEKKER (N.-M.). — *Die sporogenen Hefen*; « Centraal-Bureau voor Schimmel-cultures », Amsterdam, 547 pages, 1931.
- STÖRMER (C.) et BOUTARIC (A.). — *De l'espace à l'atome*; Alcan, Paris, 217 pages, 1929.
- TANNERY (J.). — *Science et philosophie*, Alcan, Paris, 334 pages, 1924.
- THIRY (G.). — *De l'unification des méthodes d'étude et d'exposition en microbiologie*; C. R. du Congrès des Soc. savantes, Sciences, 1902.
- URBAIN (G.). — *L'orientation des doctrines chimiques*, in L'orientation actuelle des Sciences, Alcan, Paris, 1930.
- VLÈS (F.). — *Précis de chimie-physique*, Vigot Frères, Paris, 414 pages, 1929.
- WELLS (G.-H.). — *Les aspects chimiques de l'immunité*; traduit et annoté par L. BOEZ, Doin, Paris, 371 pages, 1928.
- WURMSER (R.). — *Oxydation et réduction*; Presses Universitaires, Paris, 376 pages, 1930.
- ZSIGMONDY. — *Traité de chimie colloïdale*, Dunod, Paris, 539 pages, 1926.
-

Nancy, le 6 janvier 1933.

Vu et bon à imprimer :

Le Doyen,

SEYOT.

Vu et permis d'imprimer :

Nancy, le 7 janvier 1933.

Président du Conseil de l'Université,

Le Recteur de l'Académie,

L. BRUNTZ.

